



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Farmacia y Bioquímica

Instituto de Química y Fisicoquímica Biológicas –

Departamento de Química Biológica

*Caracterización de los pasos  
involucrados en el transporte  
de  $K^+$  por la  $Na^+/K^+$ -ATPasa*

Tesis

Autor: Alejandro Javier Spiaggi

Director: Dr. Rolando C. Rossi

Director Adjunto: Dr. Rodolfo M. González-Lebrero

2014







A Florencia  
A mis Padres  
A mis Hermanos



## *Agradecimientos*

A Florencia, a mis padres y a mis hermanos, sin cuyo permanente apoyo y ayuda no me habría sido posible llevar a cabo este trabajo.

A mis directores Rolando Rossi y Rodolfo González-Lebrero, por su invaluable guía y consejo, su mirada crítica, su vocación docente, su generosidad y honestidad.

A mis colegas y compañeros del IQUIFIB, en especial Sergio Kaufman, Mónica Montes, José Luis Monti y Jeremías Incicco, y de la Cátedra de Química Analítica, por su ayuda, las valiosas discusiones compartidas, y por brindarme su amistad.

A Patricio J. Garrahan, fundador del grupo de trabajo del que me honra haber formado parte.

A Néstor Pellegrino, de la Cátedra de Bromatología de la Facultad de Farmacia y Bioquímica.

A Natalya Fedosova, Mikael Esmann, Birthe Jensen y Angielina Damgaard, de la Universidad de Aarhus.

Al IQUIFIB, y a su director Juan Pablo Rossi, por haberme permitido realizar este trabajo en esta prestigiosa institución.

A la Universidad de Buenos Aires, al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica.





# Índice

## PARTE A – INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

CAPÍTULO I – <i>Introducción</i> .....	3
<i>La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa: función e importancia fisiológica</i> .....	3
<i>Estructura de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa</i> .....	5
<i>Antecedentes del estudio del modelo de funcionamiento de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa</i> .....	8
Evidencias de la existencia de un mecanismo de intercambio de Na <sup>+</sup> por K <sup>+</sup> impulsado por ATP.....	8
Identificación de la maquinaria de transporte como una Mg-ATPasa activada por Na <sup>+</sup> y K <sup>+</sup> y formulación de un modelo de funcionamiento.....	9
Modelo de funcionamiento (Modelo de Albers-Post).....	10
Oclusión de los cationes transportados por la Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPasa.....	13
Estudio de la desoclusión y oclusión de K <sup>+</sup> por la ruta directa.....	15
Efectos del ATP sobre los procesos de desoclusión y de oclusión de K <sup>+</sup> a través de la ruta directa.....	20
<i>Objetivos del trabajo</i> .....	23

## PARTE B – MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO II – <i>Materiales y Métodos</i> .....	27
<i>Obtención de la preparación de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa</i> .....	27
<i>Origen de los reactivos utilizados</i> .....	27
<i>Uso de Rb<sup>+</sup> en reemplazo de K<sup>+</sup></i> .....	28

<i>Obtención de ATP libre de sodio.....</i>	28
Cuantificación de la concentración de ATP en la solución de ATP libre de sodio.....	29
Cuantificación de la concentración de imidazol en la solución de ATP libre de sodio.....	30
Cuantificación de la concentración de Na <sup>+</sup> en la solución de ATP libre de sodio.....	31
Cuantificación de la concentración de ortofosfato en la solución de ATP libre de sodio.....	31
<i>Cuantificación de la concentración de Rb<sup>+</sup> total en las soluciones comerciales de [<sup>86</sup>Rb]RbCl.....</i>	32
<i>Medios de reacción.....</i>	34
<i>Descripción general del procedimiento empleado para determinar la cantidad de Rb<sup>+</sup> ocluido.....</i>	34
Equipo de mezclado rápido.....	35
Cámara de frenado y lavado.....	37
Medidas de la cantidad de Rb <sup>+</sup> ocluido en condiciones de equilibrio.....	39
Normalización de medidas de Rb <sup>+</sup> ocluido en el equilibrio.....	39
Medidas del curso en el tiempo de la oclusión de Rb <sup>+</sup> .....	40
Cálculo de la velocidad inicial de oclusión de Rb <sup>+</sup> .....	41
Medidas del curso en el tiempo de la liberación de Rb <sup>+</sup> ocluido.....	43
Medidas del curso en el tiempo de la liberación de Rb <sup>+</sup> ocluido selectivamente en uno de los sitios de oclusión.....	44
<i>Control de las condiciones experimentales empleadas.....</i>	46
Blancos en las medidas de Rb <sup>+</sup> ocluido.....	46
Efectos de la concentración de enzima sobre las medidas de Rb <sup>+</sup> ocluido.....	47
Efecto de la fuerza iónica sobre las medidas de Rb <sup>+</sup> ocluido.....	48
<i>Análisis por regresión no-lineal de los resultados experimentales.....</i>	50
<i>Discriminación de modelos.....</i>	52

## PARTE C – RESULTADOS

<b>CAPÍTULO III – <i>Efectos del <math>Rb^+</math> y del ATP sobre la cantidad de <math>Rb^+</math> ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico</i></b> .....	57
<i>Construcción y ajuste de un modelo que describe los resultados experimentales</i> .....	65
<i>Interpretación de los resultados experimentales</i> .....	71
Máxima cantidad de $Rb^+$ ocluido y constante aparente de disociación del $Rb^+$ .....	71
Forma de la curva de incremento de la cantidad de $Rb^+$ ocluido como función de la concentración de $Rb^+$ .....	73
<b>ANEXO AL CAPÍTULO III – <i>Estudio de sistemas en equilibrio termodinámico</i></b> .....	77
<i>I. Relación entre la composición de un sistema en condiciones de equilibrio y las ecuaciones que lo describen</i> .....	77
<i>II. Formulación de un modelo mínimo a partir de las ecuaciones empíricas que describen un sistema en condiciones de equilibrio</i> .....	82
<b>CAPÍTULO IV – <i>Efectos del <math>Rb^+</math> y del ATP sobre la cinética de oclusión de <math>Rb^+</math> a través de la ruta directa</i></b> .....	85
<i>I. Curso en el tiempo de la oclusión de <math>Rb^+</math> en ausencia de ATP</i> .....	86
<i>II. Curso en el tiempo de la oclusión de <math>Rb^+</math> en presencia de 200 <math>\mu M</math> ATP</i> .....	91
<i>III. Curso en el tiempo de la oclusión de <math>Rb^+</math> en presencia de distintas concentraciones de ATP</i> .....	95
<i>IV. Efectos del ATP sobre la velocidad inicial de oclusión de <math>Rb^+</math></i> .....	99
Interpretación de las variaciones en la velocidad inicial de oclusión de $Rb^+$ ..	103
<b>CAPÍTULO V – <i>Efectos del <math>Rb^+</math> y del ATP sobre la cinética de liberación de <math>Rb^+</math> ocluido</i></b> .....	107
<i>I. Efectos del <math>Rb^+</math> sobre la liberación de <math>Rb^+</math> ocluido en ausencia de ATP y en condiciones de equilibrio termodinámico</i> .....	107

<i>II. Efectos del <math>Rb^+</math> sobre la liberación de <math>Rb^+</math> ocluido en presencia de 2 mM ATP.....</i>	111
<i>III. Efectos del ATP sobre la liberación de <math>Rb^+</math> ocluido.....</i>	115
<i>IV. Liberación de <math>Rb^+</math> localizado selectivamente en uno de los sitios de oclusión.....</i>	118
Liberación de $Rb^+$ localizado en el sitio “s”.....	119
Liberación de $Rb^+$ localizado en el sitio “f”.....	122
ANEXO AL CAPÍTULO V.....	127
 <b>PARTE D – DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	
<b>CAPÍTULO VI – Aspectos relevantes que surgen del análisis de los resultados experimentales.....</b>	133
<i>I. Efectos del <math>Rb^+</math> y del ATP sobre la cantidad de <math>Rb^+</math> ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico.....</i>	133
<i>II. Efectos del <math>Rb^+</math> y del ATP sobre la cinética de oclusión de <math>Rb^+</math> a través de la ruta directa.....</i>	136
Curso en el tiempo de la oclusión de $Rb^+$ en ausencia de ATP.....	136
Curso en el tiempo de la oclusión de $Rb^+$ en presencia de ATP.....	137
<i>III. Efectos del <math>Rb^+</math> y del ATP sobre la cinética de desoclusión de <math>Rb^+</math>.....</i>	140
Curso en el tiempo de la desoclusión de $Rb^+$ en ausencia de ATP.....	141
Curso en el tiempo de la desoclusión de $Rb^+$ en presencia de ATP.....	141
 <b>CAPÍTULO VII – Un modelo de la interacción entre <math>Na^+/K^+</math>-ATPasa, <math>Rb^+</math> y ATP.....</b>	147
<i>Análisis de los parámetros surgidos del ajuste del modelo.....</i>	157
Constante de disociación del $Rb^+$ de los sitios expuestos por el confórmero $E_1$ .....	157
Constante de disociación de los complejos formados por el ATP y la $Na^+/K^+$ -ATPasa.....	158

Velocidad del cambio conformacional entre las especies $E_1Rb_n$ y $E_2(Rb)_n$ .....	159
<i>Capacidad del modelo ajustado para reproducir los resultados experimentales</i> .....	160
Efectos del $Rb^+$ y del ATP sobre la cantidad de $Rb^+$ ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico (Capítulo III).....	162
Efectos del $Rb^+$ y del ATP sobre la cinética de oclusión de $Rb^+$ (Capítulo IV).....	164
Cinética de oclusión de $Rb^+$ en ausencia de ATP (sección I).....	164
Cinética de oclusión de $Rb^+$ en presencia de 200 $\mu M$ ATP (sección II)...	167
Cinética de oclusión de $Rb^+$ en presencia de diferentes concentraciones de ATP (sección III).....	171
Efectos del $Rb^+$ y del ATP sobre la cinética de liberación de $Rb^+$ ocluido (Capítulo V).....	173
Efectos del $Rb^+$ sobre la liberación de $Rb^+$ ocluido en ausencia de ATP y en condiciones de equilibrio termodinámico (sección I).....	174
Efectos del $Rb^+$ sobre la liberación de $Rb^+$ ocluido en presencia de 2 mM ATP (sección II).....	176
Cinética de desocclusión de $Rb^+$ localizado selectivamente en uno de los sitios de oclusión, en ausencia y en presencia de 2 mM ATP (sección IV).....	180
Cinética de desocclusión de $Rb^+$ en presencia de diferentes concentraciones de ATP (sección III).....	183
Comentarios finales.....	186
 ANEXO AL CAPÍTULO VII.....	189
I. Normalización de los resultados experimentales.....	189
Normalización de las medidas de $Rb_{ocl}$ como función del tiempo obtenidas en experimentos de oclusión.....	189
Normalización de las medidas de $Rb_{ocl}$ como función del tiempo obtenidas en experimentos de desocclusión.....	190
II. Estimación de los pesos estadísticos empleados en el proceso de regresión.....	192

1) Estimación de la magnitud del error aleatorio de las medidas de $Rb_{ocl}$ .....	192
2) Estimación del factor de peso estadístico correspondiente a cada medida de $Rb_{ocl}$ .....	194
<b>CAPÍTULO VIII – Conclusiones</b> .....	199
<i>Cantidad de <math>Rb^+</math> ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico</i> .....	199
<i>Curso en el tiempo de la oclusión de <math>Rb^+</math></i> .....	200
<i>Curso en el tiempo de la desoclusión de <math>Rb^+</math></i> .....	202
<i>Modelado de la interacción entre la <math>Na^+/K^+</math>-ATPasa, el <math>Rb^+</math> y el ATP</i> .....	203
<b>Resumen</b> .....	205
<b>Referencias bibliográficas</b> .....	207

*Solidum petit in profundis*

Lema de la Universidad de Aarhus (Dinamarca)

# **PARTE A**

## ***INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS***





---

# CAPÍTULO I

## *Introducción*

### ***La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa: función e importancia fisiológica***

La Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (o bomba de sodio) es una proteína multimérica integral de la membrana plasmática de células animales. Durante su funcionamiento transporta, en contra de su gradiente electroquímico, tres iones Na<sup>+</sup> desde el citoplasma al medio extracelular y dos iones K<sup>+</sup> en sentido inverso. Este proceso está impulsado por la energía proveniente de la hidrólisis de una molécula de adenosina-5'-trifosfato (ATP) intracelular en adenosina-5'-difosfato (ADP) y ortofosfato (Pi), siendo necesaria la presencia de Mg<sup>2+</sup> como activador esencial. Esta actividad mantiene las concentraciones citoplasmáticas de Na<sup>+</sup> y de K<sup>+</sup> en valores estacionarios cercanos a 5 – 15 mM y 140 mM frente a concentraciones externas de aproximadamente 145 mM y 5 mM, respectivamente. La existencia de estos gradientes es imprescindible para una gran diversidad de procesos:

- Como consecuencia de la estequiometría del transporte (3Na<sup>+</sup> : 2K<sup>+</sup>), en cada ciclo se produce la expulsión neta de un ión difusible, lo que contribuye a la *regulación del volumen celular*. Debido a la existencia en el interior de la célula de aniones que no pueden atravesar la membrana plasmática (principalmente proteínas, ácidos nucleicos y otros ésteres fosfóricos), los cationes y aniones que pueden hacerlo tienden espontáneamente adquirir una distribución que, si se alcanzara el equilibrio, haría que la presión osmótica del citoplasma superara a la del medio extracelular. Esto llevaría al ingreso permanente de agua a la célula y su eventual lisis. La acción de la bomba previene que se alcance ese equilibrio.

- El *mantenimiento de un potencial de membrana en reposo*, en el que se basa la capacidad de excitación de células nerviosas y musculares, la transmisión sináptica y la secreción de múltiples mediadores químicos, depende de los gradientes para  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  generados por la enzima y, de forma menos significativa, de su capacidad electrogénica (exporta de manera neta un ión positivo).
- La existencia de un gradiente electroquímico para el  $\text{Na}^+$  es crítico para la *reabsorción de  $\text{Na}^+$  y agua* del filtrado glomerular y en el intestino, y es utilizado por numerosos transportadores en diferentes tejidos para acoplar su ingreso espontáneo a la célula al ingreso de hidratos de carbono, aminoácidos, neurotransmisores y  $\text{Cl}^-$ , y la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{H}^+$ , en contra de su gradiente de concentración (*transporte activo secundario*).
- La elevada concentración intracelular de  $\text{K}^+$  es necesaria para la *actividad de diversas enzimas citosólicas*.
- El elevado consumo de ATP requerido para mantener los gradientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  (que representa, por ejemplo, más del 45% de la energía empleada por el riñón y el cerebro –Cornelius, 1996) trae aparejada una gran producción de calor, originado tanto por la reacción de hidrólisis del nucleótido como por aquéllas implicadas en las rutas metabólicas que lo regeneran. Así, el funcionamiento de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es responsable de alrededor del 20% del metabolismo basal en mamíferos, contribuyendo significativamente al *mantenimiento de la temperatura corporal* en organismos homeotermos. De hecho, existen evidencias de que uno de los mecanismos por los cuales las hormonas tiroideas promueven el incremento de la temperatura corporal es aumentando la expresión de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y la permeabilidad de la membrana a los cationes por ella transportados, impulsando el consumo y la resíntesis de ATP (Silva, 2006; y referencias en ese trabajo).

La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa está formada por dos subunidades (llamadas  $\alpha$  y  $\beta$ ) y puede también poseer una tercera subunidad (FX<sub>YD</sub>). Se ha demostrado que diversas enfermedades tienen su origen en mutaciones de los genes que codifican estas subunidades. Para ilustrar este punto, podemos mencionar que se han descrito nueve mutaciones del gen que codifica una de las isoformas de la subunidad  $\alpha$  ( $\alpha_3$ , predominante en el sistema nervioso) que generan una disminución de la afinidad por el  $\text{Na}^+$  y conducen a una variante de la Enfermedad de Parkinson (Einholm *et al.*, 2010), y que mutaciones de la

subunidad FXYD de la isoforma renal han sido asociadas a casos de hipomagnesemia humana (Geering, 2006).

Por otro lado, la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa puede ser inhibida *específicamente* por esteroides cardiotónicos como la ouabaína (Schatzmann, 1953; Glynn, 1957). Más allá de que esta propiedad tiene una clara importancia experimental como herramienta para el estudio del funcionamiento de la bomba, ella es también el fundamento del uso de esteroides como la digoxina y digitoxina para el tratamiento de la enfermedad cardíaca congestiva y arritmias. En relación con esto, es importante resaltar el actual interés por el estudio de las posibles funciones *receptoras* y de *señalización* de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, y su regulación por esteroides cardiotónicos endógenos. Esto ha sido motivado por el alto grado de conservación del sitio de unión a ouabaína a lo largo de la evolución, lo cual sugirió que podría desempeñar un papel fisiológicamente relevante. Se ha demostrado la presencia de esteroides cardiotónicos endógenos en mamíferos, pero su naturaleza es desconocida (aunque existe evidencia que propone como ligandos naturales a compuestos como la ouabaína y la marinobufagenina). Estos ligandos endógenos participarían de procesos como la regulación de la excreción renal de  $\text{Na}^+$ , de la presión arterial y la frecuencia cardíaca, el crecimiento y la movilidad celular, y la regulación de varias vías metabólicas. Sin embargo, no está claro en qué medida el mecanismo implicado en la acción de estos ligandos depende de la inhibición de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa o de la activación por la enzima de vías de señalización intracelulares (para referencias sobre este tema, ver trabajo de revisión de Lingrel de 2010).

### ***Estructura de la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa***

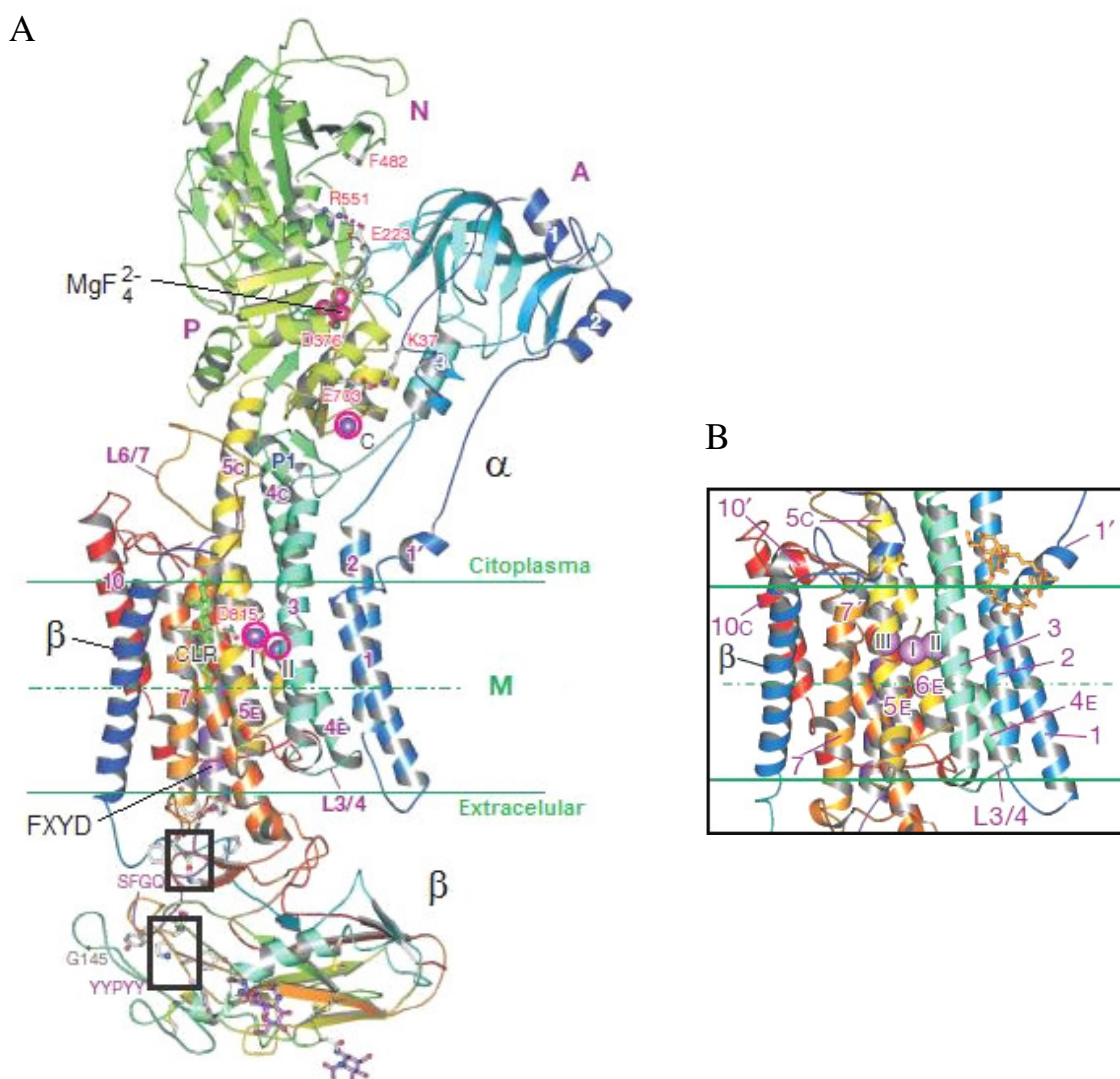
Filogenéticamente, la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa pertenece al grupo 2C de la superfamilia de ATPasas tipo P, la cual engloba una gran diversidad de bombas transmembrana con la característica común de poseer una sola subunidad catalítica y de formar durante su funcionamiento un intermediario fosforilado en un residuo conservado de ácido aspártico. La Figura I-1 (Panel A) muestra un modelo de la estructura de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa con  $\text{K}^+$  “*ocluido*” (esto es, atrapado en la maquinaria de transporte, sin acceso a los medios en contacto con las caras citosólica o extracelular de la enzima), y unida al análogo del ión ortofosfato  $\text{MgF}_4^{2-}$ . Esta estructura correspondería al estado de

transición que sigue a la desfosforilación de la enzima catalizada por  $K^+$  (ver más adelante –Esquema I-1, Reacción 5). El modelo está basado en estudios cristalográficos de la isoforma presente en glándulas rectales de tiburón (Shinoda *et al.*, 2009), aunque sus características son coincidentes con las publicadas en 2007 por Morth *et al.* (2007) para la isoforma de médula externa de riñón de cerdo.

Como se mencionó anteriormente, la enzima está formada por una subunidad  $\alpha$  (110 kDa) y una  $\beta$  (38 kDa), pudiendo estar presente también una tercera subunidad (FXYD) con funciones regulatorias. En humanos, han sido identificadas cuatro isoformas diferentes de la subunidad  $\alpha$ , tres de la  $\beta$  y al menos cinco proteínas FXYD (Palmgren y Nissen, 2011). En la  $Na^+/K^+$ -ATPasa de la médula externa renal, la subunidad FXYD se conoce como subunidad  $\gamma$  (FXYD2).

La subunidad  $\alpha$  es homóloga a ATPasas tipo P monoméricas como la  $Ca^{2+}$ -ATPasa. Consta de una gran región citoplasmática con tres dominios: A, con actividad fosfatasa, N, para unión de nucleótidos y con actividad kinasa, y P, que posee el residuo conservado de ácido aspártico que es fosforilado y un sitio para la unión de un ión  $K^+$  que, sin ser transportado, acelera la velocidad de desfosforilación (sitio C; Schack *et al.*, 2008). Además, posee un dominio con diez hélices transmembrana y una pequeña región expuesta al medio extracelular. Estudios cristalográficos han demostrado que los mismos sitios (I y II en la Figura I-1, Panel A) están implicados en la unión y oclusión de  $K^+$ ,  $Rb^+$  o  $Tl^+$ . Estos sitios se hallan en una cavidad común entre las hélices 4, 5 y 6 del dominio transmembrana, separados aproximadamente por 4Å, con el sitio I más cercano a la región citoplasmática (Morth *et al.*, 2007; Shinoda *et al.*, 2009). En el modelo de la figura no se aprecian vías de acceso a estos sitios, lo cual es compatible con la idea de que los iones están ocluidos.

Los tres sitios de unión a  $Na^+$  se encuentran en la misma región del dominio transmembrana que los sitios de unión a  $K^+$ . En la Figura I-1 (Panel B), la estructura cristalina de la  $Na^+/K^+$ -ATPasa unida a  $Na^+$ , ADP y  $AlF_4^-$  (Kanai *et al.*, 2013) permite ver que uno de los sitios (I) se localiza en una posición similar al sitio I de unión a  $K^+$ . El segundo sitio (II) se encuentra aproximadamente 5Å más próximo a la superficie citoplasmática que el sitio II para  $K^+$ , aunque la geometría de coordinación es esencialmente la misma. Finalmente, el tercer sitio (III) se localiza a la izquierda de I, en el extremo inferior de la mitad citoplasmática de la hélice 5 (hélice 5C).



**Figura I-1. (A)** Modelo de la estructura de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa unida a MgF<sub>4</sub><sup>2-</sup> y K<sup>+</sup> (adaptado de Shinoda *et al.*, 2009). Se muestran las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  y la proteína FXYD. En la subunidad  $\alpha$ , las hélices transmembrana están numeradas del 1 al 10 desde el extremo N-terminal, y también están identificados sus dominios A, N y P. Cada esfera rodeada por un círculo representa un ión K<sup>+</sup> ocluido en los sitios de transporte (I y II, entre las hélices transmembrana), o unido al sitio regulatorio citoplasmático (C). También está representado el complejo MgF<sub>4</sub><sup>2-</sup> unido al sitio de fosforilación conservado en todas las P-ATPasas (D376 en esta isoforma). Los recuadros resaltan motivos estructurales conservados, implicados en la interacción  $\alpha - \beta$ . **(B)** Detalle del dominio transmembrana en el análogo del estado de transición E<sub>1</sub>~P(Na<sub>3</sub>)·ADP unido a oligomicina (adaptado de Kanai *et al.*, 2013), para mostrar la localización de los sitios de oclusión de Na<sup>+</sup> (I, II y III). La enzima está presentada en la misma orientación que en el Panel A, y se conservan los colores y denominación de las hélices transmembrana. En ambos paneles, las líneas continuas verdes marcan la posición aproximada de los límites de la región hidrofóbica de la membrana plasmática (M).

La subunidad  $\beta$  posee una única hélice transmembrana y la mayor parte está expuesta al medio extracelular (Figura I-1, Panel A). Es exclusiva de ATPasas de tipo P que contrartransportan  $K^+$  ( $Na^+/K^+$ -ATPasa,  $H^+/K^+$ -ATPasa) y se ha propuesto que es necesaria para dirigir la subunidad  $\alpha$  a la membrana celular desde el retículo endoplásmico y para la oclusión de  $K^+$  (Lutsenko y Kaplan, 1993; Geering, 2001).

Como se mencionó arriba, en algunos tipos celulares el complejo  $\alpha\beta$  interactúa con un pequeño polipéptido hidrofóbico con una única hélice transmembrana perteneciente a la familia FXYD. Su función estaría relacionada a la regulación de la actividad de la  $Na^+/K^+$ -ATPasa de manera específica para diferentes tejidos y subunidades.

### ***Antecedentes del estudio del modelo de funcionamiento de la $Na^+/K^+$ -ATPasa***

#### ***Evidencias de la existencia de un mecanismo de intercambio de $Na^+$ por $K^+$ impulsado por ATP***

Ian Glynn, en un trabajo de revisión de 2002, expone que fue Ernest Overton quien, en 1902, formuló por primera vez la hipótesis de la existencia de un transporte activo de sodio a través de la membrana celular. Éste, mientras estudiaba el comportamiento osmótico de músculos de rana, concluyó que la estimulación del músculo debía estar asociada a un aumento transitorio en la permeabilidad de la membrana de las fibras tanto a  $Na^+$  como a  $K^+$ , y que debía existir un mecanismo que evitara que las concentraciones externa e interna de estos iones alcanzaran finalmente un equilibrio. Posteriormente, alrededor de la década de 1940, esta hipótesis fue fortalecida al demostrarse que en el músculo podía observarse una pérdida de  $K^+$  y ganancia de  $Na^+$  aproximadamente de igual magnitud luego de su estimulación o de permanecer sumergido en medios libres de  $K^+$ , y que estos cambios eran revertidos por un movimiento de  $Na^+$  y de  $K^+$  en direcciones contrarias y en contra de sus gradientes de concentración (Fenn y Cobb, 1936; Steinbach, 1940). En 1956, Glynn demostró que los movimientos activos de  $Na^+$  y  $K^+$  estaban estrechamente vinculados, de forma que la salida de  $Na^+$  requería la presencia de  $K^+$  en el exterior celular, y que incrementos de la concentración de este último se asociaban a aumentos saturables de los flujos de salida

de  $\text{Na}^+$  y de entrada de  $\text{K}^+$ , con similar afinidad aparente. Y en 1957, Post y Jolly demostraron que la estequiometría de transporte era  $3\text{Na}^+ : 2\text{K}^+$ .

En 1953 Schatzmann publicó que el glucósido cardíaco ouabaína inhibía la recaptación de  $\text{K}^+$  y la expulsión de  $\text{Na}^+$  por los glóbulos rojos. El hecho de que este efecto no estuviese asociado a una alteración de los mecanismos productores de energía llevó a pensar que su acción debía estar orientada a la maquinaria de transporte. Teniendo esto en cuenta, la observación de que el transporte activo de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  era inhibido por glucósidos cardíacos también en otros tejidos condujo a suponer que en todos los casos ese transporte debía depender de una maquinaria similar.

La demostración de que el ATP proporciona la energía para la actividad de esta “*bomba de sodio*” se basó primeramente en evidencia indirecta: la sensibilidad de los flujos activos a inhibidores de la respiración celular, como el dinitrofenol, o de la glicólisis, como el arsenato, en células aeróbicas o anaeróbicas respectivamente, siendo ya conocido que ambos procesos conducían a la síntesis de ATP (Straub, 1953; Maizels, 1954; Hodgkin y Keynes, 1955). Posteriormente, la prueba directa provino de experimentos que mostraban (1) que fantasmas de glóbulos rojos resellados con ATP en su interior acumulaban  $\text{K}^+$  activamente en ausencia de otros sustratos y aún en presencia de arsenato (Gárdos, 1954), y (2) que la inyección de ATP en el interior de axones gigantes de calamar tratados con cianuro (pero no el agregado al medio de incubación) restituía el flujo de salida de  $\text{Na}^+$ , el cual disminuía con el tiempo al ir consumiéndose el ATP (Caldwell y Keynes, 1957).

### ***Identificación de la maquinaria de transporte como una Mg-ATPasa activada por $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ y formulación de un modelo de funcionamiento***

En 1957, Skou publicó el hallazgo, en membranas de nervios de cangrejo, de una Mg-ATPasa que era activada por la presencia simultánea de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$ , y sugirió que esta enzima podía ser la misma que se creía involucrada en la expulsión de  $\text{Na}^+$  desde el interior de las fibras nerviosas. Poco tiempo después, Skou mostró que esta enzima era sensible a ouabaína (1960), y Glynn (1961) halló que eran el  $\text{K}^+$  del exterior celular y el  $\text{Na}^+$  del interior quienes activaban la ATPasa. Además, se encontró que podía detectarse similar actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en diferentes tejidos de mamíferos y que sus



propiedades coincidían con las de la bomba de sodio (Post *et al.*, 1960; Dunham y Glynn, 1961; Skou, 1962). Durante los años posteriores, trabajos realizados por numerosos investigadores confirmaron definitivamente que se trataba de la misma enzima (para referencias ver Glynn, 2002).

El descubrimiento de Skou y la identificación de la bomba de sodio con una ATPasa posibilitaron el empleo de nuevas estrategias para su estudio y para la construcción de un posible modelo de funcionamiento. Para lograr esto último, se recurrió principalmente a estudios (1) de transferencia del grupo fosfato entre ATP, ADP,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y agua (fosforilación y desfosforilación de la enzima e intercambio ATP-ADP), (2) del flujo de cationes en células intactas, y (3) de la acción de inhibidores como la ouabaína y la oligomicina. En la década de 1960, experimentos llevados a cabo por Albers *et al.* (1963) y por Post *et al.* (1965) permitieron elaborar un esquema básico del funcionamiento de la bomba, conocido luego como modelo de Albers-Post, que proponía que el eflujo de  $\text{Na}^+$  y el influjo de  $\text{K}^+$  se asociaban, respectivamente, a una reacción de fosforilación de la enzima y a la posterior hidrólisis del fosfato.

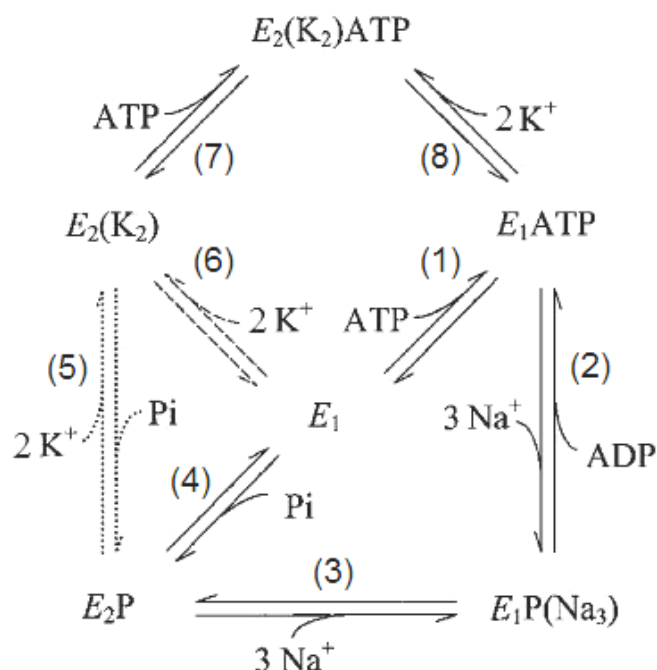
La existencia de los estados conformacionales denominados  $E_1$  y  $E_2$  fue puesta en evidencia por Jørgensen en 1975, al mostrar que la enzima desfosforilada podía generar dos patrones distintos de digestión trípica según fuese suspendida en medios de incubación con  $\text{Na}^+$  o con  $\text{K}^+$ . Además, observó que a altas concentraciones de ATP se obtenía el patrón correspondiente a  $E_1$  incluso en presencia de  $\text{K}^+$ , y que cuando la enzima era fosforilada por ATP se obtenía el patrón de  $E_2$ .

Estas evidencias, junto con la demostración de la oclusión de los iones transportados (ver siguiente sección) sirvieron de base para la elaboración del modelo más completo y actualmente aceptado que detallaremos a continuación.

#### *Modelo de funcionamiento (Modelo de Albers-Post)*

El modelo de Albers-Post es un modelo de tipo ping-pong con acceso alternante a los sitios de transporte (Esquema I-1). Según este modelo, la enzima alterna entre dos conformaciones que pueden o no estar fosforiladas, llamadas  $E_1$  y  $E_2$ . La primera posee alta afinidad por  $\text{Na}^+$  y ATP, y expone los sitios de transporte al medio intracelular,

mientras que la segunda posee alta afinidad por  $K^+$ , baja afinidad por  $Na^+$  y ATP, y expone los sitios de transporte al medio extracelular.



**Esquema I-1.** Modelo del transporte de  $Na^+$  y  $K^+$  por la  $Na^+/K^+$ -ATPasa basado en el modelo de Albers-Post.  $E_1$  y  $E_2$  representan dos conformaciones de la enzima y los cationes encerrados entre paréntesis se encuentran ocluidos. Si bien es esencial la presencia de  $Mg^{2+}$  para la formación de  $E_1P(Na_3)$  a partir de  $E_1ATP$  (reacción 2), esto no se muestra en el esquema. Las flechas punteadas muestran la llamada *ruta fisiológica* de oclusión de  $K^+$ , y las formadas por guiones, la *ruta directa*.

Para describir la secuencia de reacciones que constituyen el modelo comenzaremos por la especie  $E_1$  libre localizada en el centro del esquema. Ésta, al unir una molécula de ATP (Reacción 1) y tres iones  $Na^+$  del citosol, en presencia de  $Mg^{2+}$  (no mostrado en el esquema), cataliza la transferencia del fosfato  $\gamma$  del nucleótido al carboxilo  $\beta$  de un residuo propio de ácido aspártico (Reacción 2). Como consecuencia, el  $Na^+$  queda ocluido dentro de la proteína, formando la especie  $E_1P(Na_3)$ .

Un rápido cambio conformacional lleva a la exposición de los sitios de transporte al medio extracelular y a la reducción de la afinidad de éstos por el  $Na^+$ , el cual es liberado formándose la especie  $E_2P$  (Reacción 3). Esta reacción puede ser bloqueada mediante un pre-tratamiento de la enzima con N-etilmaleimida, oligomicina o  $\alpha$ -quimotripsina.

En ausencia de  $K^+$ , el grupo fosfato unido puede ser hidrolizado, regenerándose la especie  $E_1$  y completando el ciclo denominado  $Na^+ATPasa$  (Reacción 4). Sin embargo, la unión de dos iones  $K^+$  desde el medio extracelular a sitios de alta afinidad en  $E_2P$  acelera marcadamente esta reacción. En el proceso, los iones  $K^+$  quedan ocluidos en la enzima (Reacción 5). Cabe aclarar aquí que en nuestro laboratorio, Kaufman *et al.* (2006) demostraron que la unión de un único  $K^+$  puede acelerar la desfosforilación de  $E_2P$  (aunque en una magnitud menor que la observada cuando se unen dos iones) a través de un mecanismo que no está estequiometricamente acoplado a su oclusión. No se ha probado aún si este único  $K^+$  puede ser transportado en condiciones fisiológicas, aunque consideraciones teóricas indicarían que no (Tanford, 1983), y tampoco se ha estudiado la relación existente entre este efecto y la aceleración de la desfosforilación causada por la unión de  $K^+$  al sitio C del dominio citosólico de la enzima (ver estructura en Figura I-1).

Un cambio conformacional espontáneo puede transformar  $E_2(K_2)$  en  $E_1$  (de baja afinidad por  $K^+$ ), liberándose el  $K^+$  en el citoplasma y cerrando el ciclo  $Na^+/K^+ATPasa$  (Reacción 6). Esta reacción es lenta y representa el paso limitante del ciclo de reacciones. No obstante, puede ser acelerada por la unión de ATP a un sitio de baja afinidad en  $E_2(K_2)$ , sin ser hidrolizado (Reacciones 7 y 8). De esta manera, el nucleótido no sólo actúa como sustrato sino también como modulador alostérico.

El mecanismo de formación del intermediario con  $K^+$  ocluido que hemos descripto es conocido como *ruta fisiológica* de oclusión de  $K^+$  (flechas punteadas en el esquema). Sin embargo, la oclusión de  $K^+$  (o sus congéneres) puede ocurrir también sin mediar un intermediario fosforilado y, por lo tanto, sin el consumo de ATP, simplemente incubando la enzima en un medio de reacción sin otro ligando más que el catión. Este proceso representaría la reacción inversa al último paso del ciclo de reacciones –que regenera  $E_1$  a partir de  $E_2(K_2)$ – y es conocido como *ruta directa* de oclusión (flechas formadas por guiones en el esquema).

Con respecto a la selectividad por los iones transportados, se sabe que la bomba muestra una alta selectividad para el  $Na^+$  (el cual sólo puede ser reemplazado, aunque muy parcialmente, por  $Li^+$  y  $H^+$ ; ver Beaugé, 1978), en tanto que es mucho menos selectiva para el  $K^+$ . Así, varios iones monovalentes como  $Rb^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Tl^+$ ,  $NH_4^+$ , e incluso  $Li^+$ , pueden reemplazarlo con similares efectos. Basándose en la estructura cristalina de la

enzima con  $\text{Na}^+$  ocluido, Kanai *et al.* (2013) han propuesto que la elevada selectividad del conformero  $E_1$  por el  $\text{Na}^+$  es consecuencia del pequeño tamaño y rigidez de los sitios de transporte, que permiten la unión de  $\text{Na}^+$  pero no de  $\text{K}^+$  o  $\text{Ca}^{2+}$ ; de la proximidad de los sitios I y II para  $\text{Na}^+$  (ver Figura I-1, Panel B), que sólo permite la unión simultánea de dos iones pequeños; y del hecho que sólo el  $\text{Na}^+$ , al unirse al sitio III, puede dar lugar a los cambios conformacionales necesarios para la unión de los otros dos iones y la progresión del ciclo de reacciones.

### ***Oclusión de los cationes transportados por la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa***

Mencionamos anteriormente que un catión ocluido es aquél que se encuentra atrapado dentro de la proteína, incapaz de acceder a uno u otro de los lados de la membrana. Éste, para ser liberado, requiere que ocurra un cambio conformacional en la enzima, por lo que la velocidad de disociación observada es mucho menor ( $0,001 - 100 \text{ s}^{-1}$ ) que la esperada para la disociación de un ión de un sitio expuesto a un medio acuoso y limitada sólo por difusión ( $\sim 10^5 \text{ s}^{-1}$ ). La oclusión, por lo tanto, implica que existe una restricción al acceso a los sitios de unión, sin que exista necesariamente una elevada afinidad intrínseca de los sitios por los iones transportados (Forbush, 1988).

La oclusión de los iones transportados permite evitar que, durante el ciclo de reacciones, los sitios de transporte estén en algún momento expuestos a ambos lados de la membrana y la proteína actúe como un canal. Tanford (1983) ha demostrado en un trabajo teórico que la imposibilidad de formar un canal transmembrana abierto en ambos extremos es una restricción que debe cumplir necesariamente todo sistema que catalice el transporte *activo* de ligandos a través de la membrana celular.

La oclusión de cationes en la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa fue demostrada por primera vez, de manera indirecta, por Post *et al.* (1972). Ellos observaron que la velocidad a la cual era posible refosforilar  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa que había sido recientemente desfosforilada dependía del ión ( $\text{Li}^+$  o  $\text{Rb}^+$ , ambos congéneres del  $\text{K}^+$ ) que había catalizado la desfosforilación, aunque las condiciones de refosforilación fueran idénticas. Para explicar esto, propusieron que los iones que catalizaban la hidrólisis del fosfato quedaban ocluidos y que eran liberados sólo luego de un lento cambio conformacional (cuya velocidad dependía de la naturaleza del ión ocluido). A su vez, como la velocidad

de refosforilación era mucho mayor si se empleaban concentraciones elevadas de ATP, sugirieron que la unión del ATP a un sitio de baja afinidad podía acelerar dicho cambio conformacional. Esta acción moduladora del ATP durante la segunda porción del ciclo de reacciones explicaba por qué son necesarias, para lograr una actividad ATPasa máxima, concentraciones de ATP muy superiores a las necesarias para fosforilar la enzima. Además, era consistente con estudios previos del intercambio  $K^+/K^+$  catalizado por la  $Na^+/K^+$ -ATPasa, proceso que conduce al intercambio entre  $K^+$  intra y extracelular en relación 1:1 y que requiere la presencia de fosfato,  $Mg^{2+}$  y de elevadas concentraciones intracelulares de ATP (o ADP, desoxi-ATP, CTP, o análogos no hidrolizables del ATP) (Simons, 1974, 1975).

Posteriormente, experimentos de Karlsh *et al.* (1978b) sugirieron que podía formarse un intermediario con características análogas a las del hipotético estado con  $K^+$  ocluido de Post *et al.* cuando se incubaba  $Na^+/K^+$ -ATPasa desfosforilada en un medio de reacción con baja concentración de  $K^+$  y ausencia de  $Na^+$  y de  $Mg^{2+}$ , es decir, sin ser necesario que la enzima fuera previamente fosforilada. Esto fue confirmado en 1979 cuando Beaugé y Glynn observaron que si se incubaba  $Na^+/K^+$ -ATPasa con el isótopo radiactivo  $^{86}Rb^+$ , en ausencia de  $Na^+$ , y luego se separaba el  $^{86}Rb^+$  libre por pasaje rápido a través de una columna de intercambio catiónico, era posible detectar radiactividad en el eluido. Estos investigadores encontraron que junto con la enzima eluían aproximadamente dos  $^{86}Rb^+$  por sitio de fosforilación, y que elevadas concentraciones de ATP o  $Na^+$  impedían este efecto. En experimentos subsiguientes, Glynn y Richards (1982) emplearon un procedimiento similar para demostrar que también era posible detectar la oclusión de  $Rb^+$  luego de que éste catalizara la desfosforilación de la enzima. Esto puso en evidencia la existencia de dos rutas posibles para la formación del intermediario con  $K^+$  ocluido: las ya mencionadas *ruta fisiológica* y *ruta directa*. Glynn y Richards estimaron que se ocluían entre dos y tres iones  $Rb^+$  por sitio de fosforilación o por sitio de unión a ouabaína. Sin embargo, la estimación más precisa de la estequiometría de la oclusión de  $K^+$  a través de la ruta fisiológica fue provista por Rossi y Nørby (1993) quienes determinaron en paralelo la cantidad de intermediario fosforilado y de  $^{204}Tl^+$  ocluido como función del tiempo (en experimentos de fosforilación y de desfosforilación a 20 °C) combinando una técnica de mezclado rápido con un método para el frenado casi instantáneo de las reacciones. Sus resultados

mostraron que dos iones  $\text{Ti}^+$  eran ocluidos por cada evento de desfosforilación, independientemente de la concentración de  $\text{Na}^+$  en el intervalo 150 – 600 mM, y que ambos procesos estaban estrechamente vinculados en el tiempo (eran simultáneos o uno seguía inmediatamente al otro).

Por otro lado, la identidad de los intermediarios con  $\text{K}^+$  ocluido formados a través de ambas rutas fue sugerida por experimentos de Forbush (1987a) y luego confirmada en nuestro laboratorio (González-Lebrero *et al.*, 2002a).

Morth *et al.* publicaron en 2007 el primer estudio cristalográfico de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, precisamente de la isoforma de riñón de cerdo, con dos iones  $\text{Rb}^+$  ocluidos y unida a  $\text{MgF}_4^{2-}$  (un análogo del fosfato). Se obtuvo entonces evidencia cristalográfica del intermediario propuesto en 1972 por Post *et al.* y una descripción estructural de los sitios involucrados en la unión/oclusión de  $\text{K}^+$  ( $\text{Rb}^+$ ). Posteriormente, Shinoda *et al.* (2009) obtuvieron un modelo de alta resolución de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa de glándula rectal de tiburón, que mostraba detalles de la región extracelular de la subunidad  $\beta$  (implicada en la oclusión de  $\text{K}^+$ ) ausentes en trabajos previos.

Finalmente, también ha sido posible obtener pruebas de la oclusión de  $\text{Na}^+$  por el intermediario  $E_1\text{P}$ : Glynn *et al.* (1984) bloquearon la reacción que convierte  $E_1\text{P}$  en  $E_2\text{P}$  pretratando la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa con N-etilmaleimida o  $\alpha$ -quimotripsina y, empleando la técnica de pasaje rápido a través de una resina de intercambio catiónico a una temperatura cercana a 0 °C (para reducir la probabilidad de que el grupo fosfato de  $E_1\text{P}$  fuese transferido al ADP), encontraron que se ocluían aproximadamente tres iones  $\text{Na}^+$  por sitio de fosforilación. Y más recientemente, a través de estudios cristalográficos, Kanai *et al.* (2013) obtuvieron un modelo de alta resolución de la estructura de un análogo de  $E_1\text{P}$  unido a ADP y con tres  $\text{Na}^+$  ocluidos ( $E_1 \cdot \text{AlF}_4^- \cdot (\text{Na}_3) \cdot \text{ADP}$ ), que permitió describir la localización de los tres sitios de oclusión de  $\text{Na}^+$  y proponer un mecanismo para explicar la unión secuencial y cooperativa de este catión a  $E_1$  (ver más adelante).

### ***Estudio de la desoclusión y oclusión de $\text{K}^+$ por la ruta directa***

Para el estudio de la desoclusión y de la oclusión de  $\text{K}^+$  o sus congéneres por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa se ha recurrido a técnicas basadas en:

1) el uso de isótopos radiactivos y la separación física entre el catión libre y aquél asociado a la proteína, mediante intercambio catiónico rápido (Beaugé y Glynn, 1979) o técnicas de mucho mejor resolución temporal, como la filtración rápida ideada por Forbush (1984) o la técnica de frenado rápido y filtración diseñada por Rossi *et al.* (1999).

2) los diferentes niveles de fluorescencia (intrínseca de la bomba o de sondas unidas a ella) asociados a las formas de la enzima libres o con  $K^+$  ocluido (Karlsh *et al.*, 1978a,b; Karlsh y Yates, 1978; Montes *et al.*, 2006 y 2012).

Sin embargo, es importante aclarar que las medidas asociadas a cambios conformacionales de la enzima no reflejan necesariamente todos los procesos que conducen a cambios en la cantidad de catión ocluido (Montes *et al.*, 2006). Además, la elevada velocidad del proceso de oclusión (y de desoclusión en determinadas condiciones) limita el espectro de técnicas que es posible aplicar para su descripción temporal precisa. Así, por ejemplo, el estudio detallado de la cinética de *oclusión* a temperatura ambiente sólo ha podido ser abordado mediante el uso de equipos de mezclado rápido acoplados a un sistema para el frenado de las reacciones en el rango de los milisegundos (Rossi *et al.*, 1999).

Existe gran cantidad de evidencia experimental que indica que la máxima cantidad de  $Rb^+$  (o  $Tl^+$ ) ocluido a través de la ruta directa es de dos iones por cada unidad funcional de enzima, y que es posible la oclusión de un único ión (Forbush, 1987b; Jensen y Nørby, 1989; González-Lebrero *et al.*, 2002a,b). Los iones  $Rb^+$  localizados en cada sitio pueden ser distinguidos al estudiar su desoclusión hacia el lado *extracelular* de la bomba, sea ésta espontánea, esto es, en ausencia de otros ligandos (González-Lebrero *et al.*, 2002a, 2008), o promovida por  $Mg^{2+}$  y Pi (que consistiría en la reacción inversa de la oclusión de  $Rb^+$  por la ruta fisiológica, asociada a la desfosforilación de  $E_2P$  – Reacción 5 en el Esquema I-1) (Forbush, 1985, 1987b; Glynn *et al.*, 1985). La desoclusión en estas condiciones tiene por característica que la presencia de  $K^+$  (o sus congéneres) en el medio de reacción conduce a una marcada disminución de la velocidad de liberación del segundo ión (que tiende a un valor superior a cero para concentraciones de  $K^+$  tendientes a infinito), en tanto que la del primero no parece ser afectada. Esto se manifiesta a través de curvas cinéticas bifásicas, de amplitudes aproximadamente iguales, con una segunda fase cuya velocidad decrece al

incrementarse la concentración de  $K^+$  (o  $Rb^+$ ,  $Tl^+$  o  $Cs^+$ ). Estos cationes “bloquean” la desoclusión del segundo ion ocluido con elevada afinidad, con una selectividad que coincide con la hallada para los sitios extracelulares de transporte, y también son ocluidos (Forbush, 1987a).

Este comportamiento fue explicado suponiendo que la disposición de los sitios de oclusión es tal que sólo uno puede ser expuesto al medio de incubación (sitio *f*, respetando la nomenclatura propuesta por Forbush), y que los iones ocluidos deben atravesar ese sitio de forma *secuencial* y *ordenada*. Así, el ión localizado en el sitio *f* es el primero en ser liberado, y el segundo ión, localizado en un sitio más profundo (sitio *s*), requiere para ser liberado que antes se desocluya el primero. Sin embargo, un catión del medio de incubación puede ocupar el sitio *f* vacante y ser ocluido, quedando bloqueada la salida del segundo. El carácter bifásico de las curvas de desoclusión y la elevada afinidad aparente por el ión bloqueante sugieren que la exposición del sitio *f* es poco frecuente y muy breve, suficiente para que *sólo uno* de los iones pueda ser liberado.

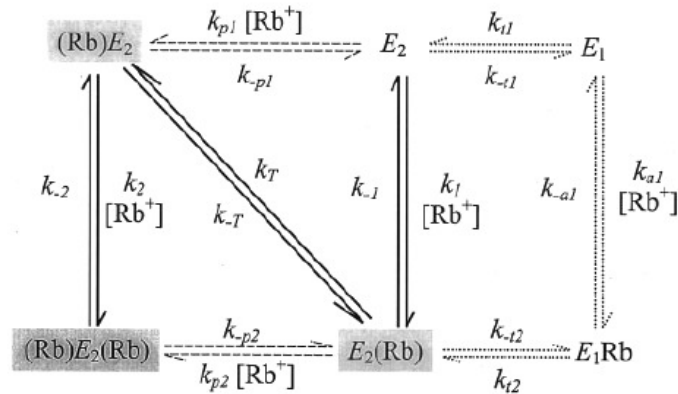
González-Lebrero *et al.* (2002a) estudiaron también el curso en el tiempo de la formación de los intermediarios con  $Rb^+$  ocluido a través de la ruta directa y la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio<sup>1</sup>, en un amplio rango de concentraciones del catión y en ausencia de  $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$  o ATP. Encontraron que las curvas de oclusión también presentaban dos fases de amplitudes similares: una fase rápida que se completaba en segundos, cuyo coeficiente de velocidad aumentaba linealmente con la concentración de  $Rb^+$  empleada, y una más lenta que se completaba en minutos, cuyo coeficiente de velocidad parecía independiente de la concentración del catión. Por otro lado, observaron que la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio aumentaba de manera hiperbólica cuando se incrementaba la concentración de  $Rb^+$  en el intervalo 0,05 - 500  $\mu M$ , con una  $K_{0,5}$  de aproximadamente 5  $\mu M$ . Esta dependencia hiperbólica era llamativa en vista de que la máxima cantidad de  $Rb^+$  ocluido indicaba una estequiometría de 2 iones ocluidos por sitio de fosforilación, aunque coincidía con resultados publicados previamente por Shani *et al.* (1987).

---

<sup>1</sup> Cuando la enzima es incubada con  $Rb^+$  en ausencia de ATP y  $Mg^{2+}$ , no posee actividad ATPasa y se alcanza un equilibrio entre las formas de la enzima libres, con  $Rb^+$  unido y con  $Rb^+$  ocluido.



En su análisis, González-Lebrero *et al.* mostraron que un modelo cinético de tipo secuencial y ordenado lograba reproducir cuantitativamente las curvas de oclusión, de desoclusión y los niveles de  $\text{Rb}^+$  ocluido en equilibrio. El modelo propuesto se muestra a continuación (Figura I-2):



**Figura I-2.** Modelo para la oclusión de  $\text{Rb}^+$  a través de la ruta directa propuesto por González-Lebrero *et al.* (2002a). El  $\text{Rb}^+$  mostrado entre paréntesis se encuentra ocluido.  $E_1$  y  $E_2$  representan dos conformaciones de la enzima y las especies sombreadas son aquellas que tienen  $\text{Rb}^+$  ocluido. La oclusión y liberación de  $\text{Rb}^+$  por  $E_2$  tendría lugar a través de la exposición del sitio  $f$  (a la derecha de  $E_2$ ) hacia el lado extracelular de la enzima. Los valores de las constantes de velocidad que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados experimentales fueron (valor  $\pm$  E.S.):  $k_1 = k_2 = 0,02547 \pm 0,00093 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ ;  $k_{-1} = k_{-2} = 0,05888 \pm 0,0025 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_T = 0,0648 \pm 0,0063 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{-T} = 0,299 \pm 0,031 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{p1} = k_{p2} = 0,00023 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ ;  $k_{-p1} = k_{-p2} = 0,00245 \pm 0,00015 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{a1} = 2 \pm 39 \text{ s}^{-1}\mu\text{M}^{-1}$ ;  $k_{-a1} = 5962 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{i1} = 0,014 \pm 0,052 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{-i1} = 0,006 \pm 0,021 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{i2} = 337 \pm 1667 \text{ s}^{-1}$ ;  $k_{-i2} = 0,09 \pm 0,11 \text{ s}^{-1}$ .

En el esquema se ve que la disposición de los sitios también trae como consecuencia que la oclusión sea ordenada: el sitio  $f$  (que en el modelo se muestra a la derecha de  $E_2$ ) es el primero en ser ocupado, y la entrada del segundo  $\text{Rb}^+$  está limitada por la velocidad a la cual el primer ión ocluido pasa a ocupar el sitio  $s$  ( $k_T$ ). En el caso de la desoclusión, el primer  $\text{Rb}^+$  puede desocluirse cuando queda expuesto el sitio  $f$ , y la liberación del segundo ión depende de (1) la probabilidad de que el sitio  $f$  esté libre, (2) la velocidad a la cual éste puede pasar del sitio  $s$  al  $f$  ( $k_{-T}$ ), y (3) la frecuencia de exposición del sitio  $f$ . Sin embargo, mencionamos anteriormente que la velocidad de desoclusión del segundo ion no tiende a cero aún cuando la concentración del ion

bloqueante tiende a infinito. Para reproducir este comportamiento, se incorporaron al modelo las reacciones caracterizadas por las constantes de velocidad  $k_{-p1}$  y  $k_{-p2}$ .

Por lo recién expuesto, el modelo permite explicar la existencia de dos fases de amplitudes similares en las curvas de oclusión y de desocclusión y el efecto que tienen incrementos en la concentración de  $\text{Rb}^+$  sobre los coeficientes aparentes de velocidad de cada fase. Por otro lado, puede verse que este modelo plantea que cuando sólo un ión se encuentra ocluido, éste puede alternar libremente entre los sitios  $s$  y  $f$ . Como consecuencia, también logra explicar por qué cuando se incubaba la enzima con  $\text{Rb}^+$  por un tiempo suficiente para que sólo *un* sitio sea ocupado, la desocclusión de este ion describe una curva bifásica (González-Lebrero *et al.*, 2002a, Figura 12).

Como muestra el esquema, existen dos caminos posibles para la oclusión de  $\text{Rb}^+$  a través de la ruta directa: la unión a sitios (de baja afinidad) expuestos por  $E_1$  del lado intracelular de la enzima, seguida por el cambio conformacional que conduce a la oclusión (flechas punteadas), o el acceso a través de sitios expuestos por  $E_2$  del lado extracelular (representado por  $k_1$  y  $k_2$ ; la unión y oclusión se muestran como un único paso). La primera alternativa encuentra sustento en experimentos que muestran que sólo el  $\text{K}^+$  con acceso a la superficie intracelular puede llevar a la enzima a formas que generan patrones de digestión con tripsina característicos de aquéllas con  $\text{K}^+$  ocluido (Karlsh y Pick, 1981), y que el  $\text{K}^+$  (o  $\text{Rb}^+$ ) actúa con baja afinidad aparente cuando se estudia su efecto sobre la *velocidad* de oclusión (Karlsh *et al.*, 1978b; González-Lebrero *et al.*, 2002a). La segunda, en el hecho que la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa inserta en proteoliposomas puede catalizar un lento intercambio entre  $\text{Rb}^+$  externo e interno en ausencia de ATP, Pi y  $\text{Mg}^{2+}$  (Karlsh y Stein, 1982).

Resulta interesante, en relación con el carácter ordenado de la oclusión y desocclusión de  $\text{Rb}^+$ , que la desocclusión y liberación de  $\text{Na}^+$  hacia el medio extracelular en la transición  $E_1\text{P}(\text{Na}_3) \rightarrow E_2\text{P}$  también ocurre de a un ión por vez, en un orden estricto (Holmgren *et al.*, 2000). Y lo mismo se ha demostrado para la unión/occlusión de  $\text{Na}^+$  desde el medio intracelular a  $E_1$  (Schulz y Apell, 1995; Castillo *et al.*, 2011). A partir de la estructura cristalina del análogo del estado de transición  $E_1\sim\text{P}(\text{Na}_3)\cdot\text{ADP}$ , Kanai *et al.* (2013) formularon un mecanismo posible para la unión secuencial de  $\text{Na}^+$ . Dichos autores proponen que la liberación de  $\text{K}^+$  desde  $E_1$  daría lugar a un cambio conformacional asociado a la rotación de la porción desplegada de la hélice transmembrana M6. Este

movimiento permitiría que el primer  $\text{Na}^+$  alcanzara el sitio III desde el citoplasma (ver Figura I-1, Panel B), a través de una cavidad cuyas dimensiones no admitirían el pasaje de  $\text{K}^+$ , y siendo necesario para esto que los sitios I y II de unión a  $\text{Na}^+$  no estén formados. La ocupación del sitio III conduciría a la formación del sitio I, y la unión del segundo  $\text{Na}^+$  a este sitio permitiría la correcta organización del sitio II. Finalmente, la unión del tercer  $\text{Na}^+$  posibilitaría la reacción de transferencia del fosfato  $\gamma$  del ATP al dominio P de la ATPasa, y la oclusión de los cationes.

Por último, se ha demostrado que la existencia de un orden en la unión y disociación de los cationes transportados no es exclusivo de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa: en la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplásmico, la oclusión de dos iones  $\text{Ca}^{2+}$  desde la superficie citoplasmática y su desocclusión en la superficie luminal del retículo también ocurren de manera secuencial y ordenada (Inesi, 1987).

### ***Efectos del ATP sobre los procesos de desocclusión y de oclusión de $\text{K}^+$ a través de la ruta directa***

El hecho de que el ATP acelera la velocidad de desocclusión de  $\text{K}^+$  o sus congéneres sin ser hidrolizado, y que ese efecto se ejerce con baja afinidad (requiere concentraciones milimolares del nucleótido), es conocido desde los ya mencionados experimentos de Post *et al.* de 1972. Se ha demostrado que el coeficiente de velocidad de la desocclusión de  $\text{K}^+$  o  $\text{Rb}^+$  en ausencia de ATP es de aproximadamente  $0,1 \text{ s}^{-1}$ , y que este valor se incrementa hasta  $20 \text{ s}^{-1}$  ( $\text{Rb}^+$ ) o  $45 \text{ s}^{-1}$  ( $\text{K}^+$ ) en presencia de ATP,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$ , con una  $K_{0,5}$  para el ATP cercana a  $0,3 \text{ mM}$ . La ausencia de  $\text{Mg}^{2+}$  reduce a la mitad el máximo coeficiente de velocidad observado, sin modificar la afinidad aparente por el ATP (Forbush, 1987a). El curso en el tiempo de la desocclusión de  $\text{Rb}^+$  en presencia de ATP,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Mg}^{2+}$  muestra al menos dos fases, siendo la amplitud de la primera superior a la de la segunda (Forbush, 1987a; González-Lebrero *et al.*, 2002a). Dado que la velocidad de la segunda fase (y de las subsiguientes, de existir) no es compatible con la velocidad global del ciclo de reacciones, se ha propuesto que estas fases corresponden a rutas no asociadas al funcionamiento fisiológico de la bomba, como por ejemplo, la desocclusión hacia el medio extracelular.

La desoclusión promovida por el nucleótido implicaría la exposición de los sitios de transporte hacia el lado citoplasmático de la enzima, como lo demuestra la observación de Glynn *et al.* (1987) de que la velocidad de desoclusión de  $^{86}\text{Rb}^+$ ,  $^{137}\text{Cs}^+$  o  $^{204}\text{Tl}^+$  a 20 °C coincide con la velocidad del cambio conformacional  $E_2 \rightarrow E_1$  en presencia de ATP (5  $\mu\text{M}$ ) y  $\text{Na}^+$ . Además, en contraste con lo observado en ausencia de ATP, no se aprecian diferencias en la velocidad de liberación de uno u otro de los iones ocluidos (Forbush, 1987b). Para explicar esto, y con el sustento de los experimentos de Glynn *et al.* recién mencionados, Forbush propuso que el cambio conformacional  $E_2 \rightarrow E_1$  es el paso limitante en la desoclusión promovida por ATP, y que ocurrido éste los iones se disocian rápidamente.

La aceleración de la desoclusión también se ve reflejada en la disminución que provoca el incremento de la concentración de ATP sobre la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico. En nuestro laboratorio, González-Lebrero *et al.* (2002b) llevaron a cabo un exhaustivo estudio de este efecto y concluyeron que la unión de ATP a la enzima provoca una marcada disminución de la afinidad aparente por el  $\text{Rb}^+$ , sin producir una modificación en su capacidad de oclusión (de forma que, independientemente de la concentración de ATP, la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido tiende a 2 moles/mol de enzima cuando  $[\text{Rb}^+]$  tiende a infinito) y que, paralelamente, se verifica una disminución de la afinidad aparente de la enzima por el nucleótido al incrementarse la concentración de  $\text{Rb}^+$ . También formularon un modelo mínimo que permitía explicar sus resultados, que proponía que existen estados de la bomba con *uno* o *dos* iones  $\text{Rb}^+$  ocluidos, y que estos estados pueden estar unidos o no a ATP.

No obstante, no se conoce aún con detalle el mecanismo por el cual el ATP ejerce los efectos mencionados. Por un lado, la existencia de más de una fase en las curvas de desoclusión promovida por ATP sugiere que al menos una fracción de los cationes son liberados de manera ordenada, existiendo algún paso lento entre la salida de ambos iones. Esto debe ser así ya que, aunque existan dos caminos alternativos posibles para la desoclusión (como se propuso anteriormente, hacia los lados intra y extracelular), si ambos implican un lento cambio conformacional seguido por la rápida disociación de los dos iones el proceso todavía podría ser descripto por una única fase exponencial. En relación con una liberación (parcialmente) ordenada, recordemos que se ha demostrado

que se forman especies unidas a ATP con un solo ión  $\text{Rb}^+$  ocluido cuando se incubaba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa con  $^{86}\text{Rb}^+$  y ATP y se permite que el sistema alcance el equilibrio.

Por otro lado, el incremento de la velocidad de desoclusión podría ser generado por un aumento en la *frecuencia* de exposición de los sitios de transporte, o en la *proporción de tiempo* que los sitios están expuestos. La primera alternativa debería también conducir a un incremento en la velocidad de *oclusión* de  $\text{K}^+$  inducida por ATP. Puede encontrarse en la literatura evidencia contradictoria en torno a este efecto, obtenida en condiciones experimentales dispares: Steinberg y Karlish (1989) no detectaron ningún efecto significativo del ATP sobre la constante observada de oclusión a 20 °C, mientras que Hasenauer *et al.* (1993) reportaron una aceleración de la oclusión inducida por el ATP en medios de reacción a 4 °C con 0,2 M sacarosa. Posteriormente, Montes *et al.* (2004) encontraron que la sonda fluorescente eosina-Y, que puede unirse al mismo sitio que el ATP y que influye de manera similar al nucleótido sobre la velocidad de desoclusión y los niveles de  $\text{Rb}^+$  ocluido en el equilibrio, causaba una disminución de la velocidad de oclusión de  $\text{Rb}^+$  a 25 °C.

---

## *Objetivos del trabajo*

Las etapas implicadas en la oclusión y la desocclusión de  $K^+$  se asocian estrechamente a la traslocación de este catión desde el medio externo al interior de la célula. Por lo tanto, la descripción del mecanismo de transporte de  $K^+$  a través de la membrana celular requiere caracterizar en detalle los pasos involucrados en aquéllos procesos, así como las modificaciones que resultan de la unión de ligandos fisiológicos con propiedades moduladoras como el ATP. Se ha estudiado ampliamente el efecto del ATP sobre la desocclusión de  $K^+$  y los niveles de  $K^+$  (o alguno de sus congéneres) ocluido en el equilibrio, aunque en condiciones experimentales dispares. Este hecho, sumado a la dificultad metodológica que conlleva el estudio de la oclusión de  $K^+$  por la rapidez de las reacciones involucradas, ha dificultado que la información existente sobre la acción moduladora del ATP sea integrada en un único modelo.

Por otro lado, la obtención de información cinética detallada aporta una referencia y un sustento para la interpretación de análisis cristalográficos de la  $Na^+/K^+$ -ATPasa, orientados a plantear cómo los cambios estructurales de la enzima hacen posibles las reacciones por ella catalizadas.

Son nuestros objetivos:

- 1) Caracterizar en detalle los efectos que ejerce el ATP sobre la cinética de oclusión (a través de la *ruta directa*) y de desocclusión de  $Rb^+$ , así como su efecto sobre la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en equilibrio, en iguales condiciones experimentales.
- 2) Interpretar los resultados en términos del conocimiento actual sobre el funcionamiento de la  $Na^+/K^+$ -ATPasa.

3) Formular un modelo cinético que reproduzca en forma global todos los resultados obtenidos, para proporcionar un esquema racional que permita comprender los pasos involucrados en la oclusión y desoclusión de  $K^+$  y la acción moduladora del ATP.

**PARTE B**

***MATERIALES Y  
MÉTODOS***





---

# CAPÍTULO II

## *Materiales y Métodos*

### *Obtención de la preparación de $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa*

Se utilizó una preparación particulada (no compartimentalizada) de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, parcialmente purificada a partir de la fracción microsomal de médula roja de riñón de cerdo, obtenida por el método descrito por Jensen *et al.* (1984). Como resultado de esta preparación se obtiene una suspensión que contiene fragmentos abiertos de membrana plasmática, con la enzima como una proteína integral. Por lo tanto, ambas caras de la membrana están en contacto con la misma solución. La unión estable de los cationes transportados a la preparación de enzima, entonces, depende exclusivamente de la formación de estados de la bomba en los que dichos cationes se encuentran “ocluidos”, luego de ser tomados desde accesos intra o extracelulares, y no de la acumulación de dichos cationes en compartimientos a través de flujos pasivos o activos.

### *Origen de los reactivos utilizados*

Todos los reactivos empleados en los experimentos presentados en esta tesis eran de calidad analítica o superior. El imidazol, el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), la sal disódica de la adenosina-5'-trifosfato ( $\text{Na}_2\text{ATP}$ ) y los cloruros de rubidio ( $\text{RbCl}$ ), de sodio ( $\text{NaCl}$ ) o de colina eran de Sigma.

El [ $^{86}\text{Rb}$ ] $\text{RbCl}$  (en solución acuosa) fue provisto por NEN Perkin Elmer.

La alameticina, un péptido formador de poros extraído de *Trichoderma viride*, fue provista por Sigma (número de catálogo A4665), y disuelta a una concentración de 20 mg/mL en una solución de etanol 60% v/v en agua.

### ***Uso de Rb<sup>+</sup> en reemplazo de K<sup>+</sup>***

En la literatura existe abundante evidencia experimental que indica que cationes como el Rb<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, Li<sup>+</sup>, Tl<sup>+</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pueden reemplazar al K<sup>+</sup>, con diferentes grados de efectividad, para producir la activación de la desfosforilación de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa. Entre ellos, el Rb<sup>+</sup> (Beaugé y Glynn, 1979), el Tl<sup>+</sup> (Rossi y Nørby, 1993) y el Cs<sup>+</sup> (Forbush, 1987b) también pueden ser ocluidos. En particular, el uso de Rb<sup>+</sup> en lugar de K<sup>+</sup> resulta útil para el estudio de intermediarios con cationes ocluidos debido a la mayor vida media del isótopo radiactivo <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (18,66 días) respecto del <sup>42</sup>K<sup>+</sup> (12,36 horas). Si bien la liberación del catión ocluido en un medio que contiene ATP, Na<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup> es entre dos y tres veces más rápida en el caso del <sup>42</sup>K<sup>+</sup>, el comportamiento de los intermediarios con <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> ocluido es esencialmente el mismo que el de aquéllos con <sup>42</sup>K<sup>+</sup>, y la oclusión de uno u otro catión no modifica, dentro del error experimental, la afinidad por ATP, ADP, MgATP o MgADP (Forbush, 1987a). Por estas razones, en todos los experimentos descriptos en esta tesis se empleó Rb<sup>+</sup> como reemplazo del K<sup>+</sup>.

### ***Obtención de ATP libre de sodio***

Es sabido que el sodio produce modificaciones en los niveles de Rb<sup>+</sup> ocluido en la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa (por ejemplo, ver González-Lebrero *et al.*, 2002b). Entonces, para poder evaluar el efecto individual del ATP sobre los procesos de oclusión y desoclusión de Rb<sup>+</sup>, fue necesario eliminar el sodio presente en las sales comerciales de ATP (Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>ATP). Se empleó para ello una resina de intercambio catiónico fuerte (Bio-Rad AG<sup>®</sup> MP-50, forma ácida) para reemplazar el Na<sup>+</sup> por imidazolio, procediendo como se detalla a continuación.

Una cantidad adecuada de resina fue hidratada suspendiéndola en agua destilada y dejándola reposar hasta el día siguiente, momento en que se descartó el líquido sobrenadante. Luego se realizaron tres lavados con agua destilada, con el fin de eliminar partículas muy pequeñas que podrían obstruir los poros en el lecho una vez armada la columna. A continuación se transfirieron 4 mL de resina hidratada a la columna, dotada de una frita de lana de vidrio, y se hicieron pasar por el lecho 20 mL de agua destilada.

Los grupos ácidos de la resina fueron neutralizados por pasaje de una solución de imidazol 2 M hasta registrar pH alcalino en el eluido. Todo el imidazol que no se hallaba como imidazolio neutralizando las cargas negativas fijas en la resina fue eliminado por lavado con agua destilada hasta registrar un pH cercano a 6 en el eluido.

Luego se sembraron 2,5 mL de una solución que contenía 0,5 g de la sal disódica del ATP (aproximadamente 0,9 mmoles) y una cantidad equimolar de imidazol (el pH de esta solución es cercano a 6). La recolección del eluido comenzó luego de descartar las primeras gotas. Finalizada la siembra se hicieron pasar por la columna 5 mL de agua destilada y el eluido fue recogido junto con la fracción anterior. El pH de la solución resultante fue llevado a 7 mediante el agregado de imidazol.

La cuantificación de la concentración final de ATP, imidazol,  $\text{Na}^+$  remanente y fosfato (que refleja la cantidad de ATP hidrolizado, ya sea en la sal comercial o durante el proceso) fue realizada como se detalla en los apartados siguientes.

#### *Cuantificación de la concentración de ATP en la solución de ATP libre de sodio*

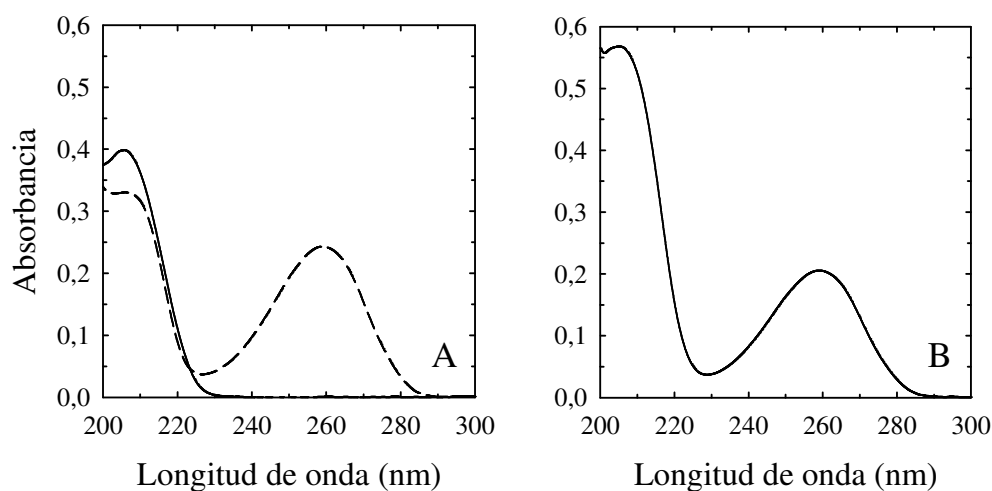
La cuantificación del ATP en el eluido de la columna de intercambio catiónico fue llevada a cabo mediante espectrofotometría empleando un equipo Jasco V-630 Bio.

Para ello se realizaron, por duplicado, diferentes diluciones del eluido, mezclando una parte del mismo con entre 2000 y 20000 partes de una solución de fosfato de sodio 50 mM de pH 7,0. La absorbancia de estas soluciones fue medida a 259 nm y fue graficada como función del factor de dilución del eluido, obteniéndose una relación lineal. Se comprobó que el imidazol, presente también en el eluido, no contribuye a la absorbancia a esa longitud de onda (ver Figura II-1).

La concentración de ATP en el eluido fue calculada ajustando una función lineal a los resultados y dividiendo el valor ajustado de la pendiente de la recta por la absortividad del ATP a la longitud de onda y pH de trabajo ( $15,4 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$ , tomado de Sober, H. A., ed. [1970]. *CRC Handbook of Biochemistry*, 2da. edición) y la longitud del paso óptico (1 cm).

*Cuantificación de la concentración de imidazol en la solución de ATP libre de sodio*

La concentración de imidazol también fue determinada espectrofotométricamente. Esta cuantificación era importante para poder controlar la concentración total de imidazol en los medios de reacción, y así su fuerza iónica. Las determinaciones fueron realizadas midiendo la absorbancia a 206 nm de diluciones independientes del eluido. A esa longitud de onda absorben tanto el ATP como el imidazol, como puede comprobarse en la Figura II-1, donde se muestra un barrido espectral obtenido a pH 7,0 para soluciones de imidazol 75  $\mu\text{M}$  (trazo continuo) y de  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP}$  16  $\mu\text{M}$  (trazo punteado).



**Figura II-1.** *Panel A:* Espectros de absorción de una solución de  $\text{Na}_2\text{H}_2\text{ATP}$  16  $\mu\text{M}$  (trazo discontinuo) y de una solución de imidazol 75  $\mu\text{M}$  (trazo continuo), ambas a pH 7,0, en presencia de fosfato de sodio 50 mM. *Panel B:* Espectro de absorción de una solución generada mezclando 3 partes del eluido de la columna de intercambio catiónico, consistente en una mezcla de ATP e imidazol, con 20000 partes de una solución de fosfato de sodio 50 mM pH 7,0. Las concentraciones calculadas de ATP y de imidazol en el eluido fueron 13,3 y 54,7  $\mu\text{M}$  respectivamente. El espectro de absorción de la solución de fosfato de sodio 50 mM fue restado en todos los casos.

La absorptividad del imidazol y del ATP a esa longitud de onda y a pH 7,0 fue determinada experimentalmente empleando cinco concentraciones de cada especie, obteniendo valores de  $5,317 \pm 0,014 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$  para el imidazol y de  $20,722 \pm 0,067 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$  para el ATP. El valor obtenido para el primero es similar al

informado para la *L*-histidina en una solución 0,01 M de HCl ( $5,7 \text{ cm}^{-1}\text{mM}^{-1}$  a 212 nm, Saidel *et al.*, 1952).

Con estos valores, junto con la absorbancia a 206 nm de la dilución del eluido y la concentración del ATP (determinada a 259 nm como se explicó arriba) pudo calcularse la concentración de imidazol en el eluido empleando la siguiente ecuación:

$$[\text{imidazol}]_{\text{eluido}} = \frac{\text{Abs}_{206} - \epsilon^{\text{ATP}} \cdot l \cdot f \cdot [\text{ATP}]_{\text{eluido}}}{\epsilon^{\text{imz}} \cdot l \cdot f}$$

donde  $\text{Abs}_{206}$  representa la absorbancia de la dilución del eluido medida a 206 nm,  $\epsilon^{\text{ATP}}$  y  $\epsilon^{\text{imz}}$  la absortividad del ATP y del imidazol, respectivamente, a esa longitud de onda,  $l$  el paso óptico y  $f$  el factor de dilución. Típicamente, la relación molar entre imidazol y ATP resultó igual a 4.

#### *Determinación de la concentración de $\text{Na}^+$ remanente en la solución de ATP libre de sodio*

La concentración de sodio remanente en el eluido fue determinada mediante espectroscopía de emisión atómica, con un equipo Perkin Elmer AAnalyst 400 Atomic Absorption Spectrometer. La relación molar entre el sodio y el ATP resultó en todos los casos menor al 0,03%.

#### *Determinación de la concentración de ortofosfato libre en la solución de ATP libre de sodio*

La concentración de ortofosfato libre (Pi) en el eluido fue estimada mediante el método desarrollado por Baginski *et al.* (1967), de acuerdo con el procedimiento propuesto por Esmann (1988). Este método es alrededor de ocho veces más sensible que el tradicional método de Fiske-Subbarow. Está basado en la reacción entre ortofosfato y molibdato en medio ácido para formar el complejo  $\text{H}_3\text{PO}_4 \cdot 10\text{MoO}_3 \cdot \text{Mo}_2\text{O}_5$ , donde el molibdeno es fácilmente reducible por ácido ascórbico otorgando a la solución un color azul que es

medido a 850 nm. Para la calibración se emplearon soluciones con una concentración de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  entre 0 y 40  $\mu\text{M}$ , obteniéndose una respuesta lineal.

Se ha comprobado que elevadas concentraciones de ATP pueden interferir con la formación de color, y es posible que esto se deba a la unión del ATP al molibdato, impidiendo su reacción con el fosfato (Baginski *et al.*, 1967). Sin embargo, pudimos verificar que la pendiente de la recta de calibración obtenida en ausencia de ATP ( $5,259 \pm 0,023 \text{ mM}^{-1}$ ) era coincidente con la obtenida en presencia de una concentración de ATP de 0,5 mM ( $5,191 \pm 0,029 \text{ mM}^{-1}$ ). Esto sugiere que esa concentración del nucleótido no afecta la sensibilidad del método en el rango de concentraciones de Pi estudiado.

Todas las determinaciones realizadas para calcular la concentración de Pi en el eluido fueron llevadas a cabo en presencia de concentraciones de ATP inferiores a 0,5 mM, y condujeron a valores de Pi menores o iguales al 1% en relación molar con el ATP.

### ***Cuantificación de la concentración de $\text{Rb}^+$ total en las soluciones comerciales de $[\text{}^{86}\text{Rb}]\text{RbCl}$***

En la solución comercial de  $[\text{}^{86}\text{Rb}]\text{RbCl}$  empleada, menos del 0,1% del total de  $\text{Rb}^+$  corresponde al isótopo radiactivo  $^{86}\text{Rb}^+$ . Como consecuencia, y dependiendo de la actividad específica (cpm/nmol de  $\text{Rb}^+$ ) y concentración de  $\text{Rb}^+$  necesaria en cada experimento, la masa de  $\text{Rb}^+$  que provenía de la solución de  $[\text{}^{86}\text{Rb}]\text{RbCl}$  no era despreciable. Este hecho hacía necesario contar con una estimación veraz de la concentración total de  $\text{RbCl}$  en dicha solución. Para llevar a cabo esta cuantificación se empleó el método propuesto por González-Lebrero (2001), que consiste en determinar el grado en que cierta cantidad exactamente conocida de  $\text{Rb}^+$  no marcado logra inhibir la oclusión de  $^{86}\text{Rb}^+$  por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. Desde aquí, llamaremos “ $^{86}\text{Rb}^+$ ” al  $\text{Rb}^+$  total (radiactivo o no) proveniente de la solución comercial de  $[\text{}^{86}\text{Rb}]\text{RbCl}$ , y simplemente “ $\text{Rb}^+$ ” al  $\text{Rb}^+$  no radiactivo proveniente de una solución de concentración conocida de  $\text{RbCl}$ .

La función que mejor describe el incremento de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido con cambios en la concentración de  $\text{Rb}^+$ , en condiciones de equilibrio y en ausencia de otros ligandos, es una hipérbola equilátera (González-Lebrero *et al.*, 2002a,b; Capítulo III de

esta tesis). Si se cuantifica la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido en medios de reacción con  $^{86}\text{Rb}^+$  y  $\text{Rb}^+$ , este último inhibirá de manera competitiva la oclusión del primero, y la señal medida ( $Y$ ) puede ser predicha por la Ecuación II-1:

$$Y = \frac{Y_{\text{máx}} [^{86}\text{Rb}^+]}{K_{0,5} + [\text{Rb}^+] + [^{86}\text{Rb}^+]} \quad \text{Ecuación II-1}$$

En esta ecuación,  $Y_{\text{máx}}$  es la señal esperada para una concentración de  $^{86}\text{Rb}^+$  que tienda a infinito, y  $K_{0,5}$  es la concentración de  $^{86}\text{Rb}^+$  que origina una señal igual a la mitad de  $Y_{\text{máx}}$ , en ausencia de  $\text{Rb}^+$ .

La concentración de  $^{86}\text{Rb}^+$  es desconocida y es lo que se desea averiguar, pero esta variable puede ser reemplazada empleando la siguiente equivalencia:

$$[^{86}\text{Rb}^+] = \frac{CA}{AE} \quad \text{Ecuación II-2}$$

donde  $CA$  es la actividad de  $^{86}\text{Rb}^+$  presente por unidad de volumen de medio de reacción, y  $AE$  es la actividad específica de la solución comercial de  $[^{86}\text{Rb}]\text{RbCl}$ , expresada por ejemplo en cuentas por minuto (cpm) por nmol de  $\text{Rb}^+$  total. El primer factor puede ser determinado experimentalmente de manera independiente, midiendo la actividad presente en un volumen conocido de medio de reacción, mientras que del procedimiento que describiremos surge una estimación del segundo factor. A continuación se muestra la Ecuación II-1 luego de reemplazar  $[^{86}\text{Rb}^+]$  por su equivalente según II-2 y de operar algebraicamente:

$$Y = \frac{Y_{\text{máx}} CA}{(K_{0,5} + [\text{Rb}^+]) AE + CA} \quad \text{Ecuación II-3}$$

El método para estimar  $AE$ , y así  $[^{86}\text{Rb}^+]$ , consiste en medir la cantidad (en cpm) de  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido en medios de reacción con la misma concentración de enzima y diferentes valores de las variables  $[\text{Rb}^+]$  y  $CA$  convenientemente elegidos (ver más adelante), y ajustar los parámetros  $Y_{\text{máx}}$ ,  $K_{0,5}$  y  $AE$  de la Ecuación II-3 al conjunto de resultados. La



concentración de  $^{86}\text{Rb}^+$  en la solución comercial se calcula a partir de la Ecuación II-2 y de las diluciones efectuadas.

El diseño del procedimiento fue optimizado (ver González-Lebrero, 2001) para que las estimaciones de los parámetros de la Ecuación II-3 presenten las menores varianza y covarianza, empleando tres combinaciones de las variables  $CA$  y  $[\text{Rb}^+]$ . Según este diseño las condiciones a evaluar son:

- 1) ausencia de  $\text{Rb}^+$  y  $CA$  tal que se obtenga una señal ( $Y_1$ ) cercana a  $Y_{\text{máx}}$ ;
- 2) ausencia de  $\text{Rb}^+$  y  $CA$  tal que se obtenga una señal igual a  $Y_1/2$ ;
- 3) presencia de  $\text{Rb}^+$  en una concentración tal que, en presencia de una  $CA$  igual a la empleada en la condición (1), se obtenga una señal igual a  $Y_1/2$ .

### ***Medios de reacción***

Todos los experimentos fueron realizados a 25 °C, en medios de reacción que contenían una solución amortiguadora imidazol.HCl 25 mM (pH 7,4) y EDTA 0,25 mM. Las concentraciones de RbCl y de ATP (como sal de imidazolio) fueron las indicadas en cada caso.

### ***Descripción general del procedimiento empleado para determinar la cantidad de $\text{Rb}^+$ ocluido***

En todos los experimentos presentados en esta tesis se empleó la llamada “ruta directa de oclusión” (ver Introducción) para formar los estados de la enzima con  $\text{Rb}^+$  ocluido. La determinación de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (que abreviaremos  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$ ) se llevó a cabo empleando la técnica descrita por Rossi *et al.* (1999). A continuación expondremos brevemente el procedimiento general empleado para llevar a cabo estas determinaciones. En los apartados subsiguientes describiremos en detalle los equipos utilizados y el procedimiento seguido en cada clase de experimento en particular.

Las mezclas de reacción, que contenían la enzima,  $^{86}\text{Rb}^+$ , y algún otro ligando de ser necesario, fueron generadas ya sea dentro de un equipo de mezclado rápido (EMR, ver Figura II-2), o manualmente, y luego fueron incubadas durante el tiempo necesario.

Transcurrido este tiempo, la reacción fue detenida inyectando la mezcla reactiva por medio del EMR dentro en una cámara de frenado y lavado (CFL) conectada a una línea de vacío. Por la CFL fluía una solución de lavado a una temperatura entre 0 y 2 °C que contenía imidazol.HCl 10 mM (pH 7,4) y KCl 30 mM a un caudal aproximado de 40 mL/s.

En la CFL, el frenado de la reacción se consigue mediante una rápida disminución de la temperatura, la dilución de los reactivos y la separación de la enzima de los reactivos libres por filtración a través de un filtro de celulosa de 0,8 µm de poro ubicado en la CFL. En el filtro quedan retenidos los fragmentos de membrana donde se halla inmersa la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa junto con el Rb<sup>+</sup> ocluido. El Rb<sup>+</sup> libre y el resto de los reactivos no quedan retenidos y son lavados. El volumen de mezcla reactiva inyectada en la CFL era el necesario para recoger al menos 30 µg de proteína en el filtro. La presencia de KCl en la solución de lavado lleva a una disminución significativa de la retención inespecífica de <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> en el filtro (González-Lebrero, 2001).

Los filtros fueron secados y luego se determinó la radiactividad presente en ellos en un contador de centelleo líquido empleando como solución centelladora una mezcla de 2,5-difeniloxazol (PPO, 4 g/L) y 1,4-bis[2-(5-feniloxazolil)]-benceno (POPOP, 0,2 g/L) en tolueno.

La radiactividad expresada en cuentas por minuto (cpm) fue convertida en nmoles de Rb<sup>+</sup> ocluido dividiéndola por la actividad específica del <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> (expresada en cpm/nmol) presente en el medio de reacción, que fue determinada en cada experimento.

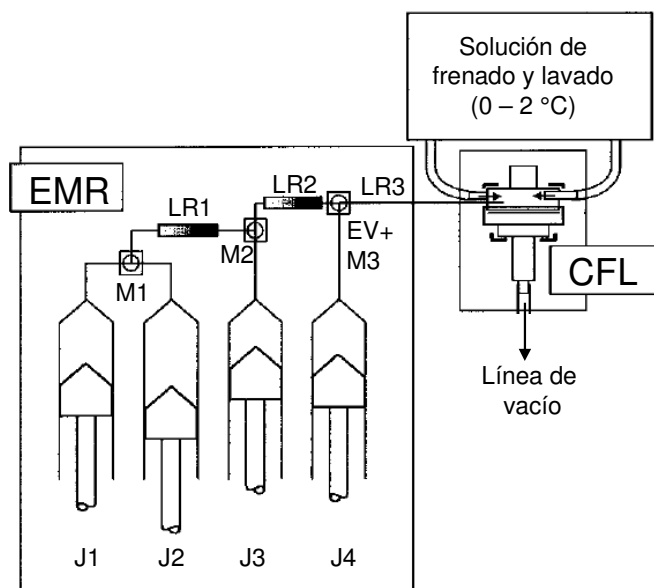
### *Equipo de mezclado rápido*

Como se explicó arriba, para realizar los experimentos descriptos en esta tesis se empleó un equipo de mezclado rápido modelo SFM-4 de BioLogic (Francia) de tipo “quenched-flow”. Este equipo (Figura II-2) consta de:

- 1) cuatro jeringas de movimiento independiente (J1 a J4) de 20 mL de capacidad para impulsar las soluciones de los distintos reactivos que generarán la mezcla reactiva,
- 2) mezcladores de alta eficiencia (M1 a M3),
- 3) líneas de retardo (LR1 a LR3),

4) electroválvula (EV) que permite dirigir fracciones de la mezcla reactiva en dos direcciones (típicamente, una de esas direcciones lleva al descarte y la otra al dispositivo de frenado y recolección –en nuestro caso la CFL).

Las jeringas, los mezcladores y las líneas de retardo son mantenidos a una temperatura constante gracias a un circuito de agua termostatzada que fluye dentro del EMR.



**Figura II-2.** Arreglo en serie del equipo de mezclado rápido (EMR) y la cámara de frenado y lavado (CFL) empleado para la cuantificación de  $\text{Rb}^+$  ocluido. El EMR consta de cuatro jeringas de movimiento independiente (J1 a J4) para contener los reactivos, tres mezcladores (M1 a M3), tres líneas de retardo (LR1 a LR3) donde tienen lugar las reacciones, y una electroválvula (EV) para descartar fracciones de la mezcla reactiva. LR3 es un tubo externo flexible que permite transferir la mezcla reactiva desde el EMR a la CFL. El EMR y la LR3 se encontraban termostatzados a 25 °C en todos los experimentos. La CFL consiste de dos piezas que sostienen entre ellas un filtro Millipore® de 55 mm de diámetro y 0,8  $\mu\text{m}$  de poro, y se mantienen juntas mediante una pinza de acero inoxidable (para una descripción detallada de la CFL ver el texto y la Figura II-3).

Cada jeringa posee un émbolo impulsado por un motor independiente de gran precisión controlado por un microprocesador. Estos motores permiten impulsar volúmenes desde 5  $\mu\text{L}$  y generar caudales entre 0,05 y 10 mL/s. El volumen impulsado por cada jeringa en cada momento, así como el caudal, son elegidos por el experimentador, lo cual permite generar diferentes diluciones dentro del equipo.

El EMR dispone de líneas de retardo con un volumen entre 17 y 1000  $\mu\text{L}$  para ser empleadas en las posiciones identificadas como LR1 y LR2 en la Figura II-2. La línea de retardo LR3 consiste en un tubo plástico externo cuya longitud y diámetro pueden ser modificados para conseguir el volumen deseado, y permite conducir la mezcla reactiva desde el EMR hasta la CFL. El tiempo de reacción equivale al tiempo que demora la mezcla reactiva en llegar desde el mezclador donde fue generada hasta donde es detenida. Este tiempo puede ser modificado variando los volúmenes de las líneas de retardo y el caudal con que se impulsa la mezcla. Además, el EMR permite interrumpir el movimiento de las jeringas durante varios segundos o minutos para prolongar el tiempo de evolución de la reacción. Con estas herramientas, pueden conseguirse tiempos de reacción desde 3 milisegundos hasta decenas de minutos.

Dependiendo de las exigencias del diseño experimental, el EMR permite utilizar sólo 1 o 2 líneas de retardo con 1 o 2 mezcladores, respectivamente. También es opcional el uso de la electroválvula.

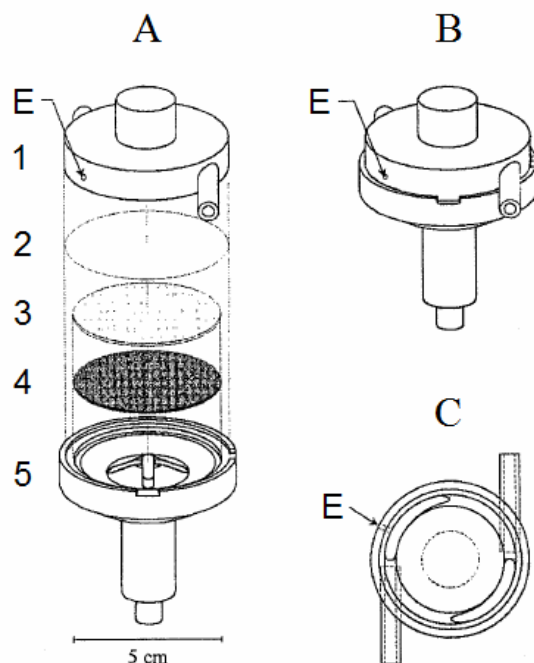
### *Cámara de frenado y lavado*

La cámara de frenado y lavado permite detener una reacción por medio de un repentino descenso de la temperatura y dilución de los reactivos. Constituye un método no desnaturalizante que, al ser aplicado a reacciones que involucren enzimas en preparaciones particuladas (fragmentos de membrana, como es nuestro caso, o vesículas) permite simultáneamente aislar la proteína de los reactivos libres y retenerla sobre un filtro manteniendo su integridad estructural.

La CFL está basada en la cámara desarrollada por Rossi y Nørby (Rossi y Nørby, 1993) para el estudio de la oclusión de cationes en la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, y su operación fue extensamente caracterizada en nuestro laboratorio (Rossi *et al.*, 1999).

La Figura II-3 muestra los componentes de la CFL. Ésta consiste en dos tapas desmontables de plexiglás. La inferior aloja, en orden ascendente, un tamiz de acero inoxidable, un prefiltro plástico y un filtro de celulosa de 0,8  $\mu\text{m}$  de poro y 5,5 cm de diámetro (Millipore<sup>®</sup>, tipo AA). Entre la tapa superior y el filtro queda delimitado el volumen interno de la cámara (4,5 mL), donde ocurre el mezclado de la solución

reactiva con la solución de lavado. Una pinza de acero inoxidable (Arthur Thomas, N° de catálogo: 2841-D49) permite el cierre hermético de la CFL.



**Figura II-3.** *Panel A:* Componentes de la cámara de frenado y lavado. Ésta consta de una pieza superior (1), provista de los orificios de entrada para la mezcla reactiva (E) y la solución de lavado (hacia adelante y atrás del plano del esquema), un filtro Millipore® de 5,5 cm de diámetro (2), un prefiltro plástico (3), un tamiz de acero inoxidable (4) y una pieza inferior (5) con el orificio que comunica con la línea de vacío. *Panel B:* Cámara ensamblada. Las piezas superior e inferior se mantienen herméticamente unidas gracias a una pinza de acero inoxidable que no se muestra en el esquema. *Panel C:* Vista inferior de la pieza 1 del Panel A, donde se muestra la disposición de los orificios para el ingreso de la mezcla reactiva (E) y la solución de lavado. Adaptado de Rossi *et al.* (1999).

La cara lateral de la tapa superior consta de tres orificios que comunican con el interior de la cámara. Uno de ellos es perpendicular a la pared y permite el ingreso de un tubo plástico que conduce la mezcla reactiva desde el EMR (LR3 en Figura II-2). Los otros dos son tangenciales y permiten el ingreso de la solución de lavado, que se mantiene en su reservorio a una temperatura entre 0 y 2 °C gracias a un baño de agua-hielo. La posición relativa de los tres orificios es tal que genera un flujo turbulento que optimiza el mezclado de las soluciones.

La porción inferior de la CFL presenta un orificio en su base que posibilita conectar la CFL a una línea de vacío. La diferencia de presión entre el exterior y el interior de la cámara (aproximadamente 745 mm Hg) genera un flujo de solución de lavado de aproximadamente 40 mL/s. La elevada relación entre el caudal de lavado y el de la mezcla reactiva es necesaria para permitir una adecuada dilución de los reactivos y mantener la temperatura de la mezcla resultante cercana a los 2 °C en todo momento.

El tiempo que transcurre entre el ingreso de la mezcla reactiva a la CFL y el frenado completo de la reacción ha sido determinado experimentalmente, obteniéndose un valor entre 3 y 4 ms (Rossi *et al.*, 1999). Esta determinación fue realizada estudiando el curso en el tiempo de la liberación de  $\text{Rb}^+$  ocluido, en presencia de concentraciones de ATP para las cuales se obtenían coeficientes de velocidad entre 0,12 y 40  $\text{s}^{-1}$ .

### *Medidas de la cantidad de $\text{Rb}^+$ ocluido en condiciones de equilibrio*

Para determinar la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico, se mezcló en recipientes plásticos la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa (30  $\mu\text{g}$  de proteína total/mL) con la cantidad necesaria de  $^{86}\text{Rb}^+$  y de ATP para obtener las concentraciones finales indicadas en cada caso. Estas mezclas reactivas fueron incubadas a 25 °C por un lapso de tiempo entre 15 minutos y 2 horas para permitir que el sistema alcanzara el equilibrio. Transcurrido ese tiempo, la mezcla fue introducida en una de las jeringas del EMR e inyectada por duplicado en la CFL a fin de retener en un filtro a la enzima y el  $^{86}\text{Rb}^+$  que pudiera haber ocluido. Para la determinación de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido se procedió como se explicó más arriba.

### *Normalización de medidas de $\text{Rb}^+$ ocluido en el equilibrio*

En esta tesis se muestran experimentos donde se evaluó la influencia del  $\text{Rb}^+$  y del ATP sobre  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el equilibrio. A fin de poder comparar y analizar en conjunto los resultados, y reducir las inconsistencias debidas a la variabilidad entre experimentos (por ejemplo, asociada a errores aleatorios en la toma de la alícuota de enzima), se procedió a normalizar las medidas de la forma que se explica a continuación. Cada experimento fue realizado empleando una dada concentración de  $\text{Rb}^+$  y diferentes

concentraciones de ATP entre 0 y 2000  $\mu\text{M}$  (condiciones *de prueba*). A su vez, en cada experimento se incluyó una condición *de normalización* con 250  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$ , sin ATP. La cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en todas estas condiciones fue determinada por duplicado. Así, para la condición *de normalización* y para el experimento  $j$  se obtuvieron las medidas replicadas que llamaremos  $n_{j,1}$  y  $n_{j,2}$ . Suponiendo que se realizaron  $r$  experimentos, se obtuvieron entonces  $2r$  medidas de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en la condición *de normalización*.

Todas las medidas de  $\text{Rb}^+$  ocluido obtenidas en las condiciones *de prueba* propias del experimento  $j$  fueron normalizadas multiplicando cada una de ellas por un factor ( $f_j$ ) que se calculó con la siguiente expresión:

$$f_j = \frac{\sum_{j=1}^r \frac{(n_{j,1} + n_{j,2})}{2r}}{\frac{(n_{j,1} + n_{j,2})}{2}}$$

### *Medidas del curso en el tiempo de la oclusión de $\text{Rb}^+$*

Para llevar a cabo estos experimentos, se mezcló en el EMR un volumen de suspensión de la enzima (80  $\mu\text{g}$  de proteína total/mL) con igual volumen de una solución que contenía  $^{86}\text{Rb}^+$  y ATP en cantidad suficiente para obtener las concentraciones finales indicadas en cada caso. Cuando se requería que existiera una incubación previa de la enzima con el nucleótido, se mezcló manualmente la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa con el ATP y esta mezcla se incubó durante 20 minutos a 25 °C. Un volumen de esta suspensión fue luego mezclado en el EMR con igual volumen de una solución de  $^{86}\text{Rb}^+$  y ATP. La concentración de ATP en esta segunda solución era igual a la concentración de ATP libre esperada en la suspensión de enzima, calculada utilizando valores de 0,890  $\mu\text{M}$  para la constante de disociación del complejo enzima-ATP y de 2,793 nmol enzima/(mg proteína) para la concentración de enzima (ver Capítulo III, Tabla III-5). Se buscaba con esto que el mezclado no alterara la relación entre las formas de la enzima libres o unidas a ATP.

En uno u otro caso, la mezcla de enzima, ATP y  $^{86}\text{Rb}^+$  fue incubada durante diferentes periodos de tiempo en el EMR, y una vez finalizada la incubación, se procedió a inyectar la mezcla en la CFL para detener la reacción y determinar la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido de la manera detallada anteriormente.

#### *Cálculo de la velocidad inicial de oclusión de $\text{Rb}^+$*

Se determinó el curso en el tiempo de la oclusión de  $\text{Rb}^+$  como se explicó en la sección precedente, y se ajustó a estas medidas una función empírica adecuada. La velocidad inicial de oclusión de  $\text{Rb}^+$  ( $v_{ocl}$ ) fue calculada derivando la ecuación empírica ajustada respecto del tiempo ( $t$ ), y hallando el valor de la función derivada para  $t = 0$ .

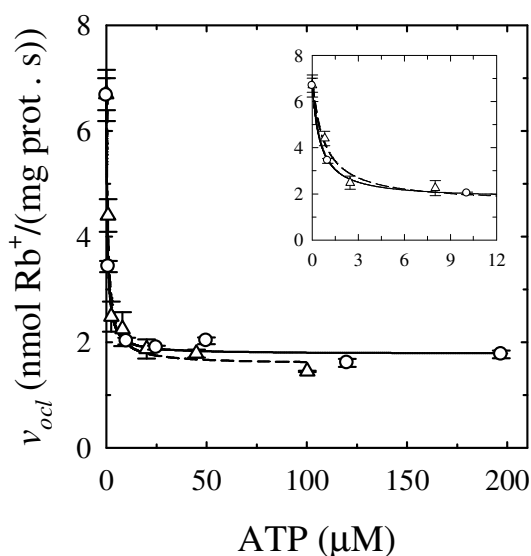
Para optimizar el número de condiciones evaluadas en un único experimento (típicamente, diferentes concentraciones de ATP) y así lograr una mayor precisión en su comparación, en gran parte de los experimentos destinados al cálculo de  $v_{ocl}$  sólo se obtuvieron, para cada condición, medidas de  $\text{Rb}_{ocl}$  correspondientes a tiempos de reacción por debajo de los 200 ms. La función empírica ajustada a estas medidas fue un polinomio de primer o de segundo grado, y luego se procedió de la manera ya explicada.

Tal como se describe en el Capítulo IV, el proceso de oclusión a través de la ruta directa muestra en su inicio una fase muy rápida y de pequeña amplitud, que en muchos casos se completa en un tiempo menor al menor tiempo evaluado. En ningún caso se tuvo en cuenta esta fase para el cálculo de la velocidad inicial de oclusión ya que (1) no siempre pudo ser correctamente caracterizada, y (2) la naturaleza del fenómeno que la origina es aún desconocida y podría no corresponder al funcionamiento fisiológico de la bomba.

En el apartado anterior se mencionó que las medidas de oclusión de  $\text{Rb}^+$  en presencia de ATP podían realizarse con o sin incubación previa del nucleótido con la enzima. Ésta última es la aproximación más práctica, especialmente si en un mismo experimento se desea estudiar el efecto que producen diferentes concentraciones de ATP. Sin embargo, la elevada velocidad del proceso de oclusión (coeficiente de velocidad aparente aproximadamente igual a  $4,5 \text{ s}^{-1}$  para  $228 \mu\text{M Rb}^+$ , González-Lebrero *et al.*, 2002a) planteó la necesidad de evaluar si, en el caso que el ATP fuese agregado a la suspensión de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa junto con el  $\text{Rb}^+$ , la unión del ATP a la enzima ocurría con la



rapidez suficiente para poder observar un efecto del nucleótido sobre la velocidad inicial de oclusión. Esto fue estudiado comparando los valores de  $v_{ocl}$  obtenidos en presencia de una concentración de  $Rb^+$  de 50  $\mu M$  y de ATP entre 0 y 200  $\mu M$ , generando la mezcla reactiva de dos formas alternativas: (1) agregando el  $Rb^+$  al mismo tiempo que el ATP a la suspensión de enzima (experimentos *sin preincubación*), o (2) agregando el  $Rb^+$  a una mezcla en equilibrio de ATP y  $Na^+/K^+$ -ATPasa (experimentos *con preincubación*). Los resultados se muestran en la Figura II-4.



**Figura II-4.** Velocidad inicial de oclusión de  $Rb^+$  ( $v_{ocl}$ ) en función de la concentración de ATP, calculada a partir de experimentos donde el ATP fue incorporado simultáneamente con el  $Rb^+$  al medio de reacción que contenía la  $Na^+/K^+$ -ATPasa ( $\Delta$ ) o incubado con la enzima durante 20 minutos a 25 °C antes del agregado de  $Rb^+$  ( $\circ$ ). Las barras de error representan  $\pm 1$  error estándar. Las líneas corresponden a una hipérbola equilátera (Ecuación II-4) ajustada a los resultados experimentales, cuyos parámetros son los informados en el texto.

Puede comprobarse que se obtienen resultados similares con ambos diseños experimentales. Para llevar a cabo una comparación más objetiva se ajustó a cada serie de resultados una hipérbola equilátera como la siguiente:

$$v_{ocl} = \frac{v_{ocl,0} K_{0,5} + v_{ocl,\infty} [ATP]}{K_{0,5} + [ATP]} \quad \text{Ecuación II-4}$$

donde los parámetros  $v_{ocl,0}$  y  $v_{ocl,\infty}$  representan el valor de  $v_{ocl}$  que corresponde a una concentración de ATP igual a cero o que tiende a infinito, respectivamente, y  $K_{0,5}$  indica la concentración de ATP que produce la mitad del cambio máximo en  $v_{ocl}$ . Los parámetros que proporcionaron el mejor ajuste se muestran en la siguiente tabla:

**Tabla II-1.** Valores de los parámetros de la Ecuación II-4 que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados a la Figura II-4.

	<i>Con preincubación</i>	<i>Sin preincubación</i>	
Parámetro	Valor $\pm$ E.S.	Valor $\pm$ E.S.	Unidades
$v_{ocl,0}$	$6,67 \pm 0,14$	$6,74 \pm 0,28$	nmol Rb <sup>+</sup> / (mg prot·s)
$v_{ocl,\infty}$	$1,778 \pm 0,067$	$1,66 \pm 0,19$	nmol Rb <sup>+</sup> / (mg prot·s)
$K_{0,5}$	$0,522 \pm 0,075$	$0,78 \pm 0,19$	$\mu$ M

Los valores fueron obtenidos por ajuste de la Ecuación II-4 a los resultados mostrados en la Figura II-4, y se informan acompañados por su error estándar (E.S.).

La tabla muestra que la existencia o no de preincubación no conduce a diferencias cuantitativas marcadas en el efecto del ATP sobre  $v_{ocl}$ .

La misma conclusión pudo extraerse de un experimento similar llevado a cabo con una concentración de Rb<sup>+</sup> de 250  $\mu$ M pero no de otro realizado con 900  $\mu$ M Rb<sup>+</sup>, en el cual sólo se pudo observar el efecto del nucleótido sobre  $v_{ocl}$  cuando el Rb<sup>+</sup> fue agregado a una mezcla en equilibrio de enzima y ATP.

Teniendo esto en cuenta, sólo se preincubó el ATP con la enzima en los experimentos realizados con concentraciones de Rb<sup>+</sup> superiores a 250  $\mu$ M.

### *Medidas del curso en el tiempo de la liberación de Rb<sup>+</sup> ocluido*

Para realizar estas medidas se incubó la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en medios de reacción que contenían <sup>86</sup>RbCl, durante un tiempo suficiente para que se alcanzara el equilibrio entre el <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> libre y el ocluido. Luego, empleando el EMR, se realizó una dilución isotópica mezclando un volumen de esta suspensión con 19 volúmenes de una solución que contenía igual concentración de RbCl no radiactivo y la cantidad de ATP necesaria para obtener la concentración final indicada en cada caso. A partir de ese momento se

procedió a determinar la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  que permanecía ocluido como función del tiempo. Se ha comprobado que la dilución de la enzima que ocurre durante la dilución isotópica del  $^{86}\text{Rb}^+$  no altera sus propiedades y, dado que la concentración de  $\text{Rb}^+$  es mucho mayor que la de la enzima, no produce una modificación en la distribución entre el  $\text{Rb}^+$  libre y el ocluido (González-Lebrero, 2001).

El ATP causa un marcado incremento de la velocidad de desoclusión de  $\text{Rb}^+$ . Podrían existir entonces condiciones en que, aun durante la incubación más breve que permite la metodología empleada, se haya liberado una cantidad significativa del catión. Para realizar una correcta estimación de los parámetros de las ecuaciones ajustadas, es importante en esos casos tener una estimación de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  a  $t = 0$  que sea independiente de la que surgiría de la extrapolación de la función de ajuste. Esa estimación independiente se consiguió registrando en cada experimento medidas de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en una condición auxiliar donde la liberación del catión era suficientemente lenta, de forma que la extrapolación de estas medidas a  $t = 0$  estaba afectada de un error despreciable. Esta condición fue lograda realizando la dilución de la mezcla de enzima y  $^{86}\text{Rb}^+$  con una solución de  $\text{RbCl}$  igual a la empleada en el experimento pero libre de ATP. El análisis por regresión se realizó ajustando simultáneamente a ambas series de medidas (de la condición de interés y de la condición auxiliar) sendas funciones empíricas forzando al programa de ajuste a asignarles el mismo valor (ajustado) de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  a  $t = 0$ .

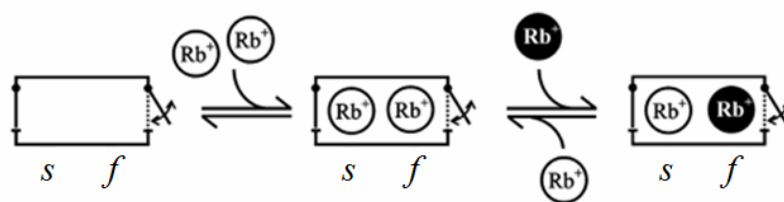
### *Medidas del curso en el tiempo de la liberación de $\text{Rb}^+$ ocluido selectivamente en uno de los sitios de oclusión*

El procedimiento que describimos a continuación fue empleado para localizar  $^{86}\text{Rb}^+$  selectivamente en uno u otro de los sitios de oclusión presentes en la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa a través de incubaciones secuenciales con  $\text{RbCl}$  (no radiactivo) y  $^{86}\text{RbCl}$ , y fue propuesto por González-Lebrero *et al.* (2008). En la Introducción denominamos a esos sitios “*sitio f*” (el más próximo a la cara extracelular) y “*sitio s*”, siendo el primero el que más rápidamente intercambia el catión ocluido por otro proveniente del medio de reacción, en medios de reacción donde el  $\text{Rb}^+$  es el único ligando de la enzima (ver Figura II-5 e Introducción).

Para localizar  $^{86}\text{Rb}^+$  en el “sitio s”, se realizó una primera incubación de la enzima en un medio de reacción que contenía  $^{86}\text{RbCl}$  100  $\mu\text{M}$  durante el tiempo necesario para que el sistema alcanzara el equilibrio (entre 15 minutos y 2 horas). Finalizado este lapso, el  $^{86}\text{Rb}^+$  ocupaba ambos sitios de oclusión. Un volumen de la suspensión resultante se mezcló con tres volúmenes de una solución de  $\text{RbCl}$  en concentración suficiente para que la suma de las concentraciones finales de  $^{86}\text{Rb}^+$  y  $\text{Rb}^+$  fuera 500  $\mu\text{M}$ , y se dejó progresar la reacción por 48 segundos. Durante ese tiempo tuvo lugar principalmente el intercambio del  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido en el “sitio f” por  $\text{Rb}^+$  no marcado presente en el medio de reacción. Entonces, finalizada esta segunda incubación, se esperaba obtener una suspensión de enzima que contiene predominantemente formas donde el “sitio s” tiene unido  $^{86}\text{Rb}^+$ , y el “sitio f”,  $\text{Rb}^+$ . Sin embargo, no es posible evitar que se formen especies donde los sitios están marcados de otra manera. Esto puede verificarse simulando un experimento como el descrito hasta aquí empleando el modelo propuesto para la oclusión de  $\text{Rb}^+$  a través de la ruta directa en ausencia de otros ligandos (González-Lebrero *et al.*, 2002a, ver Figura I-2 en la Introducción). Puede calcularse que, transcurridos 48 segundos de la segunda incubación, un 12% del total de  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido continúa ocluido en el “sitio f”. Por otro lado, el 17% del total de  $\text{Rb}^+$  no radiactivo ocluido se localiza en el “sitio s”. También puede verificarse que tiempos de incubación mayores no resultan en una marcada disminución de los porcentajes mencionados.

Cuando se deseaba localizar  $^{86}\text{Rb}^+$  en el “sitio f”, se procedió de la manera recién indicada, pero utilizando  $\text{RbCl}$  para la primera incubación, y  $^{86}\text{RbCl}$  para la segunda. El procedimiento descrito se esquematiza en la Figura II-5.

En uno u otro caso, la suspensión obtenida luego de la segunda incubación se diluyó diez veces con una solución conteniendo sólo  $\text{RbCl}$  o  $\text{RbCl}$  y  $\text{ATP}$  en cantidades suficientes para lograr concentraciones finales de 1 y 2 mM, respectivamente, y se determinó la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido remanente luego de transcurridos distintos tiempos desde esta última dilución.



**Figura II-5.** Esquema de la secuencia de incubaciones que conducen a localizar  $^{86}\text{Rb}^+$  selectivamente en uno de los sitios de oclusión (adaptado de González-Lebrero *et al.*, 2008). El rectángulo representa la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, correspondiendo su lado derecho a la cara extracelular, y “s” y “f” denotan los dos sitios donde el  $\text{Rb}^+$  puede ser ocluido. Los sitios de oclusión pueden ser expuestos al medio de incubación, permitiendo el intercambio de los iones ocluidos, a través de dos accesos representados por las puertas laterales. En las condiciones experimentales empleadas, el acceso hacia el medio extracelular, que en el esquema se muestra abierto, se abre con una frecuencia mucho mayor (ver Introducción). Los círculos blancos representan el isótopo de  $\text{Rb}^+$  presente durante la primera incubación, y los negros el presente durante la segunda.

### ***Control de las condiciones experimentales empleadas***

#### ***Blancos en las medidas de $\text{Rb}^+$ ocluido***

Se evaluaron diferentes condiciones experimentales para cuantificar la cantidad de  $\text{Rb}^+$  que era retenido de manera inespecífica en los filtros durante las medidas de  $\text{Rb}^+$  ocluido (blancos de reacción). Estas condiciones se basaron en evidencia experimental que muestra que (1) la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido disminuye con el incremento de la concentración de  $\text{Na}^+$ , siendo indetectable cuando se emplean concentraciones micromolares de  $\text{Rb}^+$  y concentraciones de  $\text{Na}^+$  superiores a 20 mM (Glynn y Richards, 1982; González-Lebrero *et al.*, 2002b), y (2) la capacidad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa para ocluir  $\text{Rb}^+$  decae con el tiempo de incubación a 56 °C con un coeficiente aparente de inactivación de  $0,141 \text{ min}^{-1}$ , en ausencia de ligandos y en un medio de reacción conteniendo imidazol.HCl a pH 7,4 (Kaufman *et al.*, 2012). Este coeficiente corresponde a un tiempo medio de inactivación de aproximadamente 4,9 minutos.

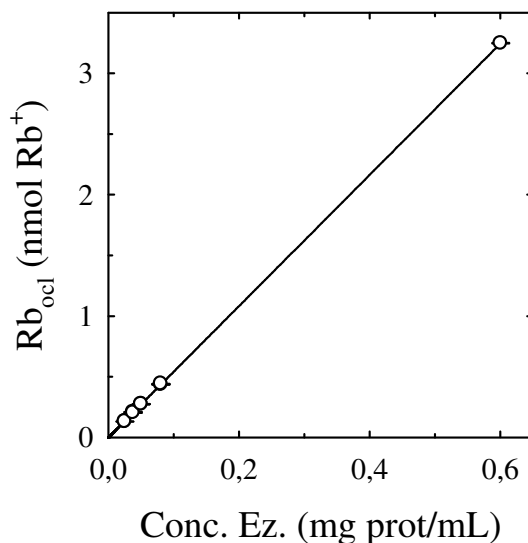
La retención inespecífica de  $\text{Rb}^+$  fue evaluada empleando medios de reacción con una concentración de  $^{86}\text{RbCl}$  de 250  $\mu\text{M}$  y que (1) contenían enzima (35  $\mu\text{g}$  de proteína/mL) y NaCl 140 mM, (2) contenían enzima (35  $\mu\text{g}$  de proteína/mL) que había perdido

prácticamente por completo su capacidad de oclusión por haber sido incubada a 56 °C durante 140 minutos, o (3) carecían de enzima. La cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  retenido por la preparación de enzima fue determinada como se explicó en “*Medidas de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en condiciones de equilibrio*”.

En estos tres casos la radiactividad retenida en los filtros fue la misma, por lo que en todos los experimentos los blancos de reacción fueron realizados con medios de incubación que no contenían  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa debido al ahorro de tiempo y de enzima que ello implicaba.

### *Efectos de la concentración de enzima sobre las medidas de $\text{Rb}^+$ ocluido*

El diseño de los experimentos presentados en esta tesis exigía el empleo de diferentes concentraciones de enzima en los medios de reacción para lograr recuperar una cantidad adecuada de la misma en los filtros (no menos de 30  $\mu\text{g}$  de proteína). Se ha demostrado que en ciertas condiciones la actividad  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, expresada en  $\mu\text{mol Pi}/(\text{mg proteína} \cdot \text{min})$ , aumenta de manera hiperbólica con la concentración de enzima, y que la mitad del cambio máximo se obtiene con una concentración de  $2,89 \pm 0,21 \mu\text{g}$  de proteína/mL (González-Lebrero, 2001). Si bien las concentraciones comunmente empleadas para medir  $\text{Rb}^+$  ocluido son al menos 8 veces superiores a ese valor, consideramos necesario comprobar si modificaciones en la concentración de enzima, dentro del intervalo de concentraciones que requerían nuestros experimentos, conducían a cambios en la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido. Para ello, se realizaron determinaciones de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  por duplicado luego de seguir el procedimiento detallado bajo el título “*Medidas de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en condiciones de equilibrio*”, empleando  $^{86}\text{RbCl}$  en una concentración de 250  $\mu\text{M}$  y cantidad suficiente de preparación de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa para obtener concentraciones de proteína total entre 0,025 y 0,6 mg/mL. Los resultados se muestran a continuación (Figura II-6).



**Figura II-6.** Cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido, en nmoles, como función de la concentración de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa presente en los medios de reacción, en mg de proteína total/mL. Las condiciones experimentales se detallan en el texto. El volumen de mezcla reactiva inyectada en la CFL fue de 1 mL. La línea de trazo continuo muestra el mejor ajuste de una función lineal que pasa por el origen de coordenadas, cuya pendiente es igual a  $5,4068 \pm 0,0066$  (nmol  $\text{Rb}^+ \cdot \text{mL}$ )/mg proteína.

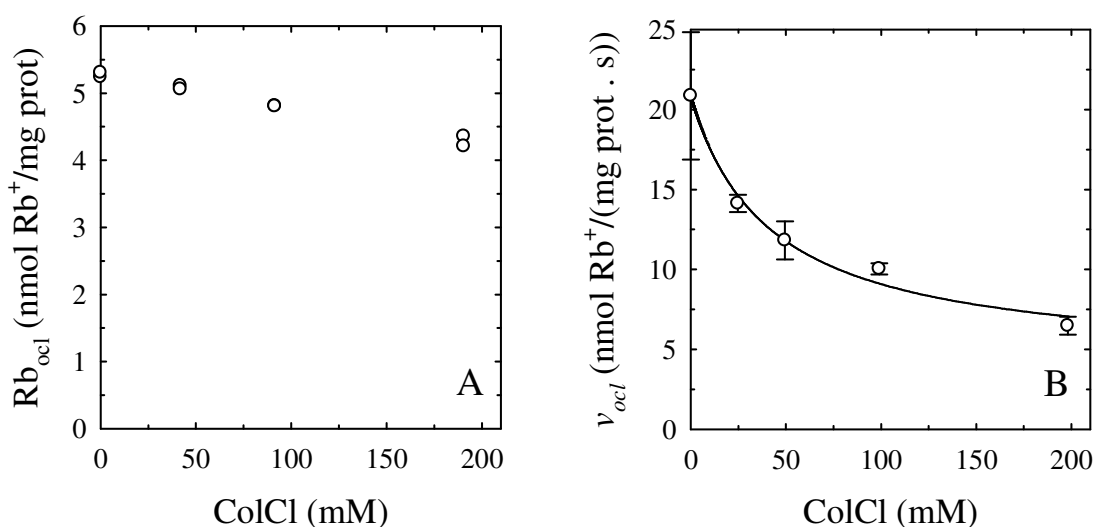
Puede comprobarse que la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido es directamente proporcional a la concentración de enzima empleada en el intervalo estudiado. Basándonos en este resultado, en todos los experimentos realizados se utilizaron concentraciones de enzima entre 0,025 y 0,6 mg/mL.

### *Efecto de la fuerza iónica sobre las medidas de $\text{Rb}^+$ ocluido*

Los ligandos de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa son especies cargadas a pH fisiológico, y su unión a la enzima depende de interacciones electrostáticas cuya magnitud es afectada por la fuerza iónica del medio de reacción. El ATP posee cuatro grupos ionizables, y puede calcularse que a pH 7,4 sólo existirán prácticamente las formas  $\text{ATP}^{3-}$  y  $\text{ATP}^{4-}$ , representando la última un 80% del total (suponiendo que  $\text{pK}_{\text{a}3}$  y  $\text{pK}_{\text{a}4}$  toman valores de 4,10 y 6,80, respectivamente, correspondientes a una temperatura de 25 °C y una fuerza iónica de 40 mM; ver IUPAC, 1991). Debido a la magnitud de la carga del nucleótido, incluso concentraciones micromolares de ATP producen un incremento significativo en la fuerza iónica del medio de reacción. Ese incremento es de

aproximadamente 8 mM por cada mmol de ATP (como sal de imidazolio) agregado por litro de solución, siendo 8,5 mM la fuerza iónica de un medio de reacción conteniendo imidazol.HCl 25 mM a pH 7,4 y 250  $\mu$ M RbCl.

Nos propusimos entonces evaluar en qué medida cambios en la fuerza iónica del medio de incubación afectaban la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, para poder definir un intervalo de concentraciones de ATP que generaran cambios despreciables debidos al incremento de la fuerza iónica. Se estudió la variación de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el equilibrio y de la velocidad inicial de oclusión en medios de reacción donde la fuerza iónica fue modificada por agregado de diferentes concentraciones de cloruro de colina. Para realizar los experimentos se siguió el procedimiento detallado en el apartado correspondiente, y se emplearon medios de reacción libres de ATP que contenían, además de la concentración deseada de cloruro de colina, 250  $\mu$ M RbCl. Los resultados se muestran en la Figura II-7.



**Figura II-7.** Cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en el equilibrio (Panel A) y velocidad inicial de oclusión (Panel B) como función de la concentración de cloruro de colina (ColCl) en el medio de reacción, en ausencia de ATP y en presencia de 250  $\mu$ M RbCl. La fuerza iónica del medio de reacción para cada concentración de cloruro de colina se obtiene sumando 8,5 mM a dicha concentración. El procedimiento experimental fue explicado en secciones anteriores. En el Panel B, las barras de error representan  $\pm 1$  E. S., y la línea continua es el gráfico de una hipérbola equilátera ajustada a los resultados y cuyos parámetros figuran en el texto.



El incremento de la concentración de cloruro de colina genera una leve disminución en la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en el equilibrio. Por otro lado, la velocidad inicial de oclusión parece ser mucho más afectada por el agregado de concentraciones similares de colina. El ajuste de una función hiperbólica (Ecuación II-5) a estos resultados permitió obtener los siguientes valores para sus parámetros:  $v_{ocl,0} = 20,73 \pm 0,84$  nmol  $\text{Rb}^+$ /(mg prot·s),  $v_{ocl,\infty} = 4,1 \pm 1,6$  nmol  $\text{Rb}^+$ /(mg prot·s), y  $K_{0,5} = 43 \pm 14$  mM.

$$v_{ocl} = \frac{v_{ocl,0}K_{0,5} + v_{ocl,\infty}[\text{ColCl}]}{K_{0,5} + [\text{ColCl}]} \quad \text{Ecuación II-5}$$

La Ecuación II-5 permite calcular que se produce una disminución de  $v_{ocl}$  menor al 10 % si la concentración de cloruro de colina en el medio de reacción es inferior a 6 mM. El incremento de fuerza iónica que genera dicha concentración de cloruro de colina es equivalente a la que se obtendría con una concentración de ATP igual a 0,75 mM.

### ***Análisis por regresión no-lineal de los resultados experimentales***

Las ecuaciones empíricas fueron ajustadas a los resultados experimentales empleando algoritmos de optimización basados en el de Gauss-Newton (Fraser y Suzuki, 1973), utilizando programas comerciales (Microsoft Excel, SigmaPlot). El análisis *global* del conjunto de resultados experimentales presentados en esta tesis, a través del ajuste del modelo cinético mostrado en la Figura VII-2 (Capítulo VII), fue realizado empleando el programa COPASI (Hoops *et al.*, 2006), disponible gratuitamente *on-line* en <http://www.copasi.org>.

En todos los casos, el proceso de ajuste se basó en la búsqueda del conjunto de parámetros que hacía mínima la siguiente función (suma de cuadrados, SC):

$$SC(\psi) = \sum_{i=1}^{nd} w_i [y_i - f(x_i, \psi)]^2 \quad \text{Ecuación II-6}$$

La función SC depende de los parámetros a ajustar representados en forma conjunta por el vector  $\psi$ , “nd” es el número de resultados experimentales, “ $y_i$ ” es el  $i$ -ésimo resultado obtenido al medir la propiedad que se desea describir con la función  $f$ , “ $w_i$ ” es el peso estadístico que corresponde a la condición experimental en que fue adquirido el resultado experimental  $y_i$ , y “ $f$ ” es la función a ajustar, que es función del conjunto de parámetros  $\psi$  y de las condiciones experimentales en que fue adquirido  $y_i$ , definidas por el valor de las variables independientes  $x_i$ . El empleo del peso estadístico  $w_i$  es necesario para que la contribución relativa de cada resultado experimental a la suma de cuadrados sea la misma, y se calcula como el recíproco de la varianza estimada del resultado  $y_i$  (el cálculo de los pesos estadísticos empleados en esta tesis se detalla en el anexo al Capítulo VII). Si el ajuste conduce al conjunto de parámetros que corresponde al mínimo absoluto de la función SC, y la función ajustada  $f$  provee la descripción matemática correcta del proceso estudiado, las diferencias  $y_i - f(x_i, \psi)$  se denominan *errores residuales* y constituyen un estimador del error aleatorio que afecta la medida  $y_i$ .

Al llevar a cabo el ajuste se supuso que las variables independientes estaban exentas de error, y que los resultados experimentales eran independientes y estaban afectados por un error aleatorio de distribución Normal con media cero (esto es, estaban exentos de errores sistemáticos).

El error estándar de los parámetros que proporcionaron el mejor ajuste fue estimado a través del cálculo de la “matriz de información” o “matriz Hessiana”  $H$  (Johnson y Frasier, 1985). Cada elemento de esta matriz,  $H_{j,k}$ , está definido de la siguiente manera:

$$H_{j,k} = \sum_{i=1}^{nd} w_i \left[ \frac{\partial f(x_i, \psi')}{\partial \psi'_j} \cdot \frac{\partial f(x_i, \psi')}{\partial \psi'_k} \right]^2$$

siendo  $f(x_i, \psi')$  la función ajustada calculada con los valores de la variable independiente correspondientes al  $i$ -ésimo resultado experimental y el conjunto de parámetros que proporcionó el mejor ajuste ( $\psi'$ ), y  $\psi'_j$  y  $\psi'_k$  son dos elementos cualesquiera del vector  $\psi'$ . Los elementos de la diagonal principal de la matriz inversa de  $H$ ,  $[H^{-1}]_{jj}$ ,

proporcionan una estimación de la varianza del parámetro  $j$  al ser multiplicados por el cociente

$$\frac{SC(\psi)}{nd - np}$$

donde  $SC(\psi)$  es la suma de cuadrados del ajuste, calculada según la Ecuación II-6 y empleando el conjunto de parámetros óptimos  $\psi$ , y “nd” y “np” representan el número de resultados experimentales y de parámetros ajustados, respectivamente. El cociente mostrado es un estimador de la varianza del error aleatorio que afecta las medidas experimentales.

### ***Discriminación de modelos***

El modelo que mejor describía los resultados experimentales fue seleccionado empleando el Criterio de Información Asistótico (Yamaoka *et al.*, 1978), *corregido* para que fuera válido incluso en casos en que la relación entre el número de resultados experimentales y el número de parámetros ajustados era inferior a 40 (AICc; Burnham y Anderson, 2002). Se calculó, para cada modelo, el valor de AICc dado por la siguiente ecuación:

$$AICc = nd \cdot \ln\left(\frac{SC(\psi)}{nd}\right) + \frac{2 \cdot (np + 1) \cdot nd}{nd - np - 2}$$

donde “nd” es el número de resultados experimentales, “np” el número de parámetros ajustados, y  $SC(\psi)$  la suma de cuadrados calculada según la Ecuación II-6 con los parámetros que brindaron el mejor ajuste. Según este criterio, el modelo que mejor describe la información experimental es aquél con el que se obtiene el menor valor de AICc, indicando que presenta el mejor balance entre minimización de SC y reducción del número de parámetros. Debe tenerse en cuenta (1) que no hay restricciones en cuanto a la estructura de los modelos que se comparan, y (2) que este criterio sólo

señala el mejor de los modelos *sometidos a comparación* y no permite descartar que haya otros modelos mejores aún no evaluados.

Este criterio permite a su vez estimar cuánto mayor es el soporte empírico del modelo con el menor AICc respecto de otro modelo. Esa información se obtiene calculando el valor de R (conocido como *evidence ratio*):

$$R = e^{0,5(AICc_{mayor} - AICc_{menor})}$$

El valor de R indica cuántas veces más probable es que el modelo seleccionado sea el que mejor describe la información experimental contra otro modelo de mayor AICc.



## **PARTE C**

### ***RESULTADOS***



---

## CAPÍTULO III

### *Efectos del $Rb^+$ y del ATP sobre la cantidad de $Rb^+$ ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico*

El objetivo de este trabajo de tesis es formular un modelo cinético detallado que describa la interacción entre la  $Na^+/K^+$ -ATPasa, el  $Rb^+$  y el ATP, con el fin de conocer en mayor profundidad el papel modulador que ejerce este último sobre los procesos de oclusión y de desoclusión del catión, ambos estrechamente relacionados a su transporte a través de la membrana plasmática. Para eso, se estudió la cinética de formación de los estados de la enzima con  $Rb^+$  ocluido a través de la *ruta directa*, la cinética de liberación de  $Rb^+$  de dichos estados, y la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio, empleando diferentes concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP.

Comenzaremos la descripción de los resultados obtenidos mostrando las variaciones que sufre la cantidad de  $Rb^+$  ocluido por cambios en las concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP, en condiciones en que el sistema se encuentra en equilibrio termodinámico. Estos experimentos fueron escogidos como punto de partida dado que permiten obtener una caracterización general del comportamiento del sistema en una condición límite, en presencia de una amplia variedad de concentraciones de  $Rb^+$  y ATP. A su vez, la información surgida de ellos sirvió como control adicional del procedimiento experimental por comparación con datos existentes en la literatura (González-Lebrero *et al.*, 2002b), y para seleccionar los niveles de concentración de ligandos a emplear en los experimentos cinéticos.

Las medidas presentadas serán analizadas en base a los principios tratados en el anexo que sigue a este capítulo a fin de formular un modelo mínimo que las explique. Este



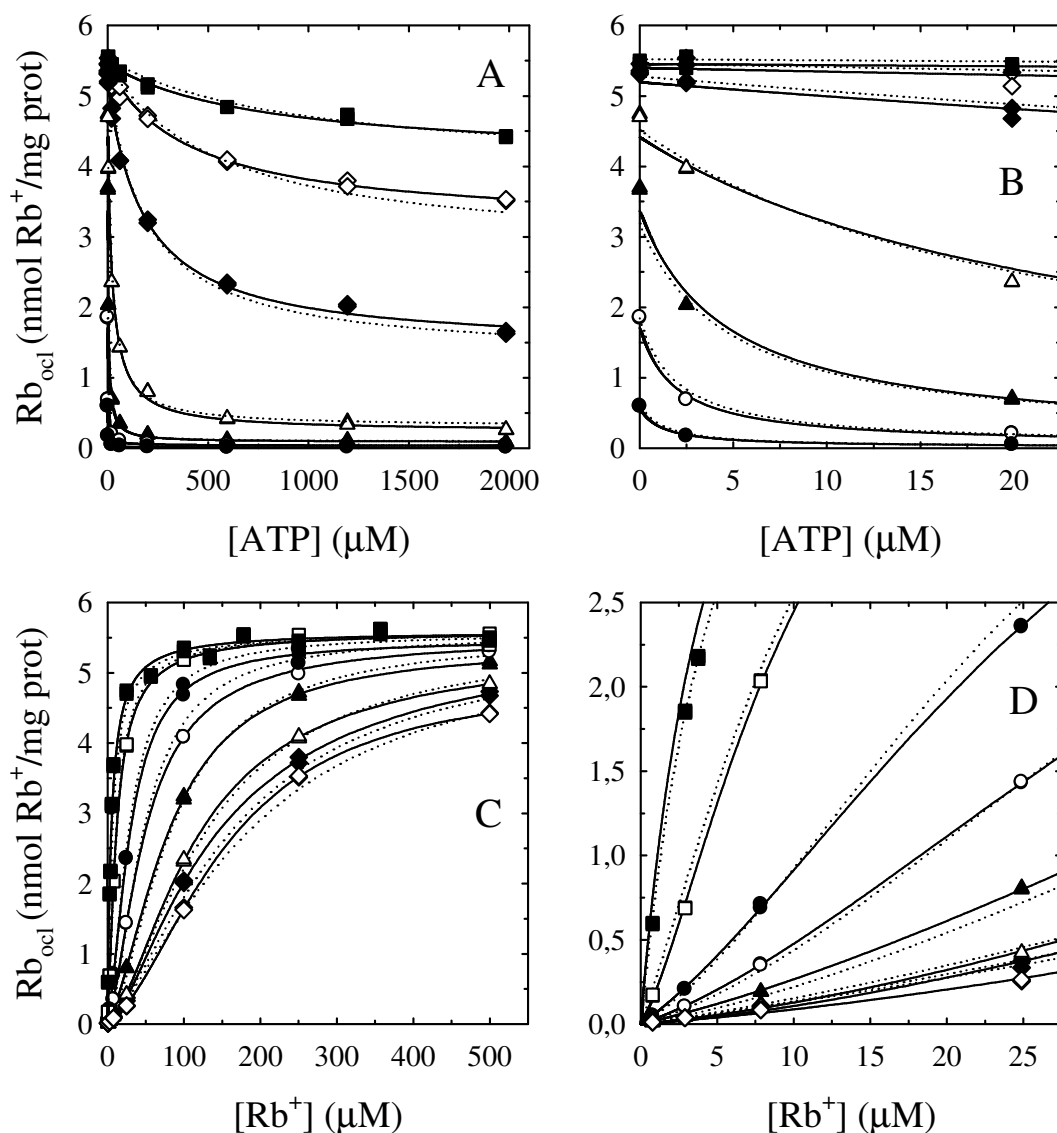
modelo servirá como base para la construcción de un modelo más detallado que describa *todos* los resultados presentados en esta tesis *en conjunto*, luego de incorporar las modificaciones sugeridas por el análisis de los estudios cinéticos.

En la Figura III-1 se grafican los resultados de experimentos donde se determinó la cantidad de Rb<sup>+</sup> ocluido (Rb<sub>ocl</sub>) luego de incubar la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa en medios de reacción con concentraciones de Rb<sup>+</sup> entre 0,78 y 500 µM y de ATP entre 0 y 2000 µM por un periodo de tiempo suficiente para que el sistema alcanzara el equilibrio. Éstos se muestran como función de la concentración de ATP (Paneles A y B) o de la concentración de Rb<sup>+</sup> (Paneles C y D).

En presencia de una concentración de Rb<sup>+</sup> fija (Paneles A y B), el incremento de la concentración de ATP genera una disminución monótona de Rb<sub>ocl</sub> hasta valores distintos de cero. Puede advertirse también que, al ser mayor la concentración de Rb<sup>+</sup>, el efecto del ATP es menos evidente y aumenta la concentración de ATP necesaria para observar la mitad del cambio máximo. Los resultados experimentales obtenidos para cada concentración del catión fueron adecuadamente descriptos por la siguiente función hiperbólica de [ATP], representada en el gráfico por las líneas de trazo continuo:

$$Rb_{ocl} = \frac{Rb_{ocl,0} K_{ATP} + Rb_{ocl,\infty} [ATP]}{K_{ATP} + [ATP]} \quad \text{Ecuación III-1}$$

Los parámetros  $Rb_{ocl,0}$  y  $Rb_{ocl,\infty}$  corresponden a la cantidad de Rb<sup>+</sup> ocluido medida cuando la concentración de ATP es cero o tiende a infinito, respectivamente, y  $K_{ATP}$  indica la concentración del nucleótido que produce la mitad de la disminución máxima en el nivel de Rb<sup>+</sup> ocluido. Los valores de los parámetros obtenidos por el ajuste de esta ecuación a los resultados de la Figura III-1A se grafican en los Paneles A y B de la Figura III-2 como función de la concentración de Rb<sup>+</sup>.



**Figura III-1.** Medidas de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en el equilibrio. Los medios de reacción contenían una concentración de  $\text{Rb}^+$  de 0,78 ( $\bullet$ ); 2,9 ( $\circ$ ); 7,9 ( $\blacktriangle$ ); 25 ( $\triangle$ ); 100 ( $\blacklozenge$ ); 250 ( $\diamond$ ) o 500 ( $\blacksquare$ )  $\mu\text{M}$  (A y B) o de ATP de 0 ( $\blacksquare$ ); 2,5 ( $\square$ ); 20 ( $\bullet$ ); 60 ( $\circ$ ); 199 ( $\blacktriangle$ ); 595 ( $\triangle$ ); 1194 ( $\blacklozenge$ ) o 1984 ( $\diamond$ )  $\mu\text{M}$  (C y D). Los Paneles B y D muestran un detalle de las medidas correspondientes a las menores concentraciones de ATP y  $\text{Rb}^+$ , respectivamente. En los Paneles A y B, las líneas de trazo continuo son la representación de la Ecuación III-1, y en los Paneles C y D, de la III-2 (ATP 0  $\mu\text{M}$ ) o III-3, resueltas con los parámetros que permitieron obtener el mejor ajuste a cada serie de resultados experimentales. Las líneas punteadas corresponden al cálculo de  $\text{Rb}_{\text{oci}}$  empleando la Ecuación III-6, deducida del modelo del Esquema III-1 (que se presenta más adelante en el capítulo), luego de asignar a sus parámetros los valores ajustados que se muestran en la Tabla III-4.

El Panel C de la Figura III-1 muestra que al aumentar la concentración de  $Rb^+$  en medios de reacción sin ATP,  $Rb_{ocl}$  aumenta de manera hiperbólica. En cambio, la presencia de ATP en concentraciones fijas y cada vez mayores produce un incremento de  $Rb_{ocl}$  que describe curvas sigmoides de afinidad progresivamente menor. Las funciones empíricas que mejor describieron los resultados corresponden a la Ecuación III-2 para las medidas obtenidas en ausencia de ATP, y a la Ecuación III-3 para el resto de las medidas, y están representadas con líneas de trazo continuo en los Paneles C y D de la Figura III-1:

$$Rb_{ocl} = \frac{N_1 [Rb^+]}{1 + D_1 [Rb^+]} \quad \text{Ecuación III-2}$$

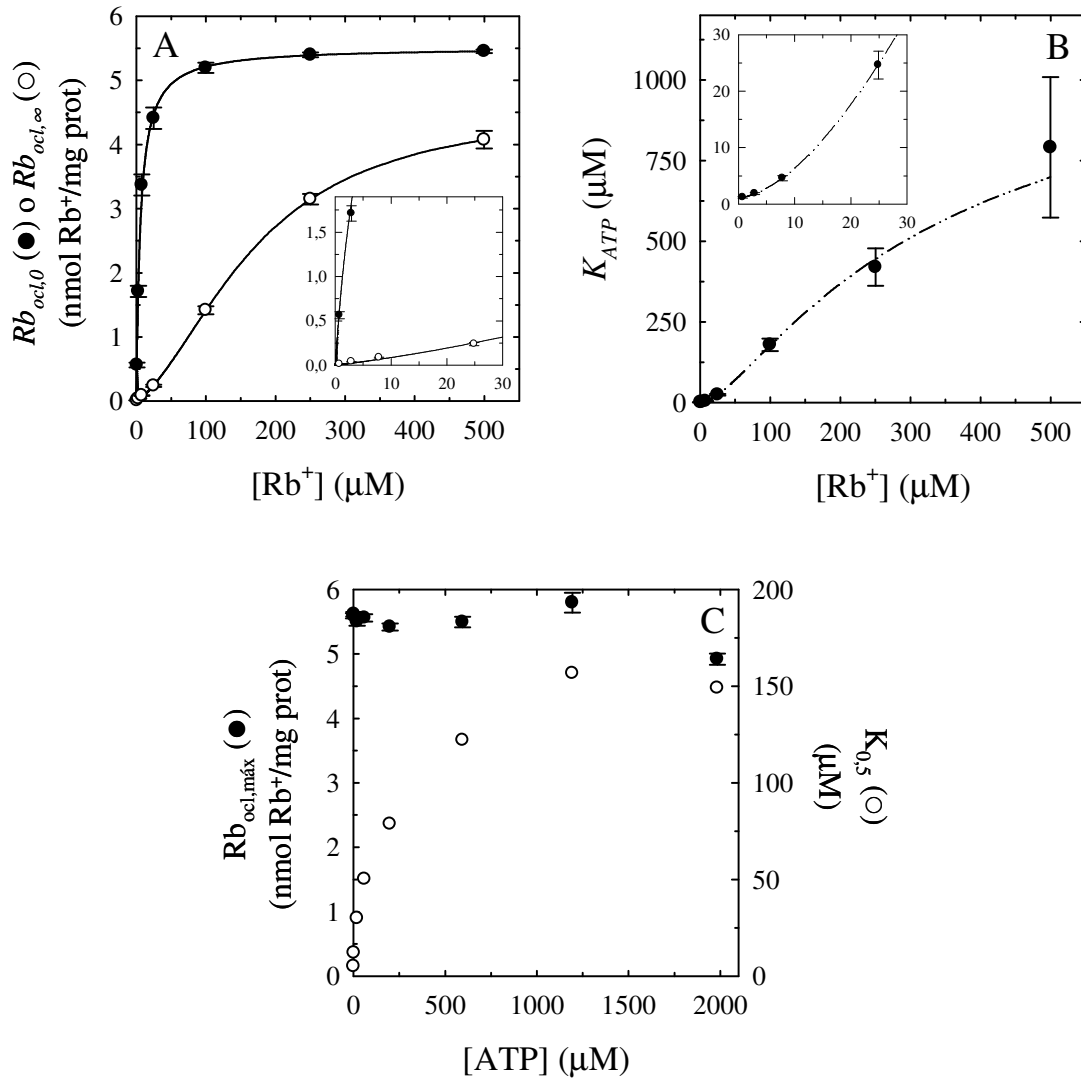
$$Rb_{ocl} = \frac{N_1 [Rb^+] + N_2 [Rb^+]^2}{1 + D_1 [Rb^+] + D_2 [Rb^+]^2} \quad \text{Ecuación III-3}$$

La máxima cantidad de  $Rb^+$  que puede ser ocluido ( $Rb_{ocl,m\acute{a}x}$ ) corresponde al valor límite que toman las ecuaciones anteriores cuando  $[Rb^+]$  tiende a infinito, y equivale al cociente  $N_1/D_1$  para la Ecuación III-2, y al cociente  $N_2/D_2$  para la Ecuación III-3.

Por otro lado, la concentración de  $Rb^+$  para la cual  $Rb_{ocl}$  es igual a la mitad de  $Rb_{ocl,m\acute{a}x}$  (y a la que llamaremos  $K_{0,5}$ ) puede ser calculada, para la Ecuación III-2, como  $1/D_1$ , y para la Ecuación III-3, resolviendo la ecuación

$$D_2 N_2 [Rb^+]^2 + (2 D_2 N_1 - N_2 D_1) [Rb^+] - N_2 = 0$$

Los valores de  $Rb_{ocl,m\acute{a}x}$  y de  $K_{0,5}$ , calculados para cada concentración de ATP, se grafican en el Panel C de la Figura III-2.



**Figura III-2.** Paneles A y B: Valores de los parámetros  $\text{Rb}_{\text{ocl},0}$  (●) y  $\text{Rb}_{\text{ocl},\infty}$  (○) (A), y  $K_{\text{ATP}}$  (B) de la Ecuación III-1 que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados de los Paneles A y B de la Figura III-1 correspondientes a la concentración de  $\text{Rb}^+$  que figura en abscisas. Los gráficos insertos muestran en detalle los valores de los parámetros para las menores concentraciones de  $\text{Rb}^+$ . Las líneas representan las Ecuaciones III-2 ( $\text{Rb}_{\text{ocl},0}$ ), III-3 ( $\text{Rb}_{\text{ocl},\infty}$ ) y III-4 ( $K_{\text{ATP}}$ ) calculadas con los parámetros de la Tabla III-1. **Panel C:** Cantidad máxima de  $\text{Rb}^+$  ocluido ( $\text{Rb}_{\text{ocl},\text{máx}}$ , ●) y concentración de  $\text{Rb}^+$  necesaria para obtener una cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido igual a la mitad de  $\text{Rb}_{\text{ocl},\text{máx}}$  ( $K_{0,5}$ , ○) como función de la concentración de ATP. El cálculo de  $\text{Rb}_{\text{ocl},\text{máx}}$  y de  $K_{0,5}$  a partir de las Ecuaciones III-2 y III-3 fue explicado en el texto. En todos los paneles las barras de error indican  $\pm 1$  error estándar estimado.

Las curvas del Panel A de la Figura III-2 muestran los valores que toma  $Rb_{ocl}$  al incrementarse la concentración de  $Rb^+$  en los límites en que la concentración de ATP es cero o tiende a infinito. De manera consistente con los resultados experimentales de los dos paneles inferiores de la Figura III-1, la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en medios carentes de ATP ( $Rb_{ocl,0}$ ) presenta un aumento hiperbólico con la concentración de  $Rb^+$ , en tanto que  $Rb_{ocl,\infty}$  responde a una función sigmoide de la concentración del catión. Las funciones que mejor describieron la variación de  $Rb_{ocl,0}$  y  $Rb_{ocl,\infty}$  respecto de la concentración de  $Rb^+$  fueron las Ecuaciones III-2 y III-3, respectivamente. En la siguiente tabla se informan los valores de los coeficientes de dichas funciones que proporcionaron el mejor ajuste.

**Tabla III-1.** Valores de los coeficientes de las Ecuaciones III-2 y III-3 que brindaron el mejor ajuste a los parámetros  $Rb_{ocl,0}$  y  $Rb_{ocl,\infty}$  (Figura III-2A)

Ecuación	III-2 ( $Rb_{ocl,0}$ )	III-3 ( $Rb_{ocl,\infty}$ )	
Coeficiente	Valor $\pm$ E.S.	Valor $\pm$ E.S.	Unidades
$N_1$	$0,950 \pm 0,057$	$(7,4 \pm 1,1) \cdot 10^{-3}$	nmol $Rb^+$ / (mg prot· $\mu$ M)
$N_2$		$(1,30 \pm 0,28) \cdot 10^{-4}$	nmol $Rb^+$ / (mg prot· $\mu$ M <sup>2</sup> )
$D_1$	$0,172 \pm 0,011$	$(1,63 \pm 0,73) \cdot 10^{-3}$	$\mu$ M <sup>-1</sup>
$D_2$		$(2,84 \pm 0,50) \cdot 10^{-5}$	$\mu$ M <sup>-2</sup>

Los valores fueron obtenidos por ajuste de las Ecuaciones III-2 y III-3 a los valores de los parámetros  $Rb_{ocl,0}$  y  $Rb_{ocl,\infty}$  de la Ecuación III-1, y se informan acompañados por su error estándar (E.S.).

La concentración de  $Rb^+$  necesaria para que  $Rb_{ocl,0}$  alcance la mitad de su valor máximo es  $5,80 \pm 0,39 \mu$ M, en tanto que para  $Rb_{ocl,\infty}$  es aproximadamente 28 veces mayor ( $161 \pm 30 \mu$ M). Esta disminución de la afinidad aparente por el  $Rb^+$  inducida por el ATP se encuentra caracterizada en la Figura III-2C. Allí se muestra, con símbolos vacíos, el valor de  $K_{0,5}$  de las curvas de  $Rb_{ocl}$  versus  $[Rb^+]$  de la Figura III-1C, el cual parece aumentar en forma saturable con la concentración de ATP. El ajuste de una función hiperbólica (no mostrado en la figura) permitió estimar que la mitad del incremento máximo se obtiene con una concentración de ATP igual a  $170 \pm 44 \mu$ M.

El valor límite que toman  $Rb_{ocl,0}$  y  $Rb_{ocl,\infty}$  cuando la concentración de  $Rb^+$  tiende a infinito equivale al cociente entre los parámetros  $N_1$  y  $D_1$  de la Tabla III-1 para  $Rb_{ocl,0}$ , y entre  $N_2$  y  $D_2$  para  $Rb_{ocl,\infty}$ . El cálculo de estos cocientes proporcionó valores próximos entre sí ( $5,516 \pm 0,071$  y  $4,59 \pm 0,19$  nmol / mg proteína, respectivamente), y similares a la cantidad máxima de  $Rb^+$  ocluido estimada a partir de las curvas de  $Rb_{ocl}$  versus  $[Rb^+]$  ( $Rb_{ocl,máx}$ , símbolos llenos en la Figura III-2C). Esto sugiere que la cantidad máxima de  $Rb^+$  que puede ser ocluido a través de la ruta directa no es modificada sensiblemente por la unión de ATP. Además, teniendo en cuenta que la concentración de enzima activa en la preparación de  $Na^+/K^+$ -ATPasa es de  $2,52 \pm 0,10$  nmol / mg proteína (calculado a partir de determinaciones de la cantidad de enzima fosforilada en estado estacionario realizadas por Monti, 2010), los valores calculados se traducen en una estequiometría de dos moles de  $Rb^+$  por mol de enzima. Este resultado coincide con el informado por otros investigadores (Forbush, 1987a; González-Lebrero *et al.*, 2002b).

Es importante aclarar aquí que, considerando la estequiometría recién señalada, la función que relaciona  $Rb_{ocl}$  con la concentración de  $Rb^+$  en ausencia de ATP (III-2) debería ser un cociente de polinomios de *segundo grado* como pudo demostrarse para medios de reacción con ATP (Ecuación III-3), aun cuando los resultados de las Figuras III-1C, III-2A y evidencia experimental previa (ver, por ejemplo, González-Lebrero *et al.*, 2002a) demuestran que en esas condiciones  $Rb_{ocl}$  es una función *hiperbólica* de la concentración de  $Rb^+$ . Es posible demostrar que la Ecuación III-3 se reduce a la III-2, y por lo tanto predice un incremento hiperbólico de  $Rb_{ocl}$ , si se cumple la siguiente igualdad:

$$(N_2)^2 = N_1 (N_2 D_1 - N_1 D_2)$$

Entonces, para mayor claridad en el análisis, resultaría válido considerar que la función que mejor describe el incremento de  $Rb_{ocl}$  con la concentración de  $Rb^+$  es, en todo el rango de concentraciones de ATP evaluado, la Ecuación III-3. El incremento hiperbólico de  $Rb_{ocl}$  observado en ausencia del nucleótido sería consecuencia de una particular relación entre las constantes de equilibrio del sistema que hace que se cumpla la igualdad mencionada y, por lo tanto, que la Ecuación III-3 pueda ser simplificada para dar la ecuación de una hipérbola.

Puede obtenerse también importante información estudiando el comportamiento de  $Rb_{ocl,\infty}$  predicho por la Ecuación III-3 cuando la concentración de  $Rb^+$  toma valores próximos a cero. En esa situación,  $Rb_{ocl,\infty}$  puede ser aproximado por la siguiente ecuación lineal:

$$Rb_{ocl,\infty} = N_1 [Rb^+]$$

Concentraciones muy bajas de  $Rb^+$  hacen despreciable la probabilidad de que la enzima se encuentre unida simultáneamente a dos iones  $Rb^+$ . Por lo tanto, si fuera posible detectar  $Rb^+$  ocluido en esas condiciones ( $N_1 > 0$ ), sería a expensas de la oclusión de un único catión. En efecto, la inspección de la Tabla III-1 permite corroborar que el valor ajustado de  $N_1$  para la Ecuación III-3 es significativamente mayor que cero, lo cual indica que existe formación de especies con *un solo*  $Rb^+$  ocluido aun cuando la concentración de ATP tiende a infinito.

Analicemos ahora el parámetro  $K_{ATP}$  de la Ecuación III-1, que se relaciona con la afinidad *aparente* con que el ATP ejerce su efecto inhibitor sobre la oclusión de  $Rb^+$ . En el Panel B de la Figura III-2 puede verse que este parámetro aumenta marcadamente y de manera sigmoide al incrementarse la concentración de  $Rb^+$ . Esta observación está de acuerdo con la disminución de la afinidad aparente por el  $Rb^+$  inducida por el ATP ( $K_{0,5}$  en la Figura III-2C). La Ecuación III-4 proporcionó la mejor descripción de la evolución de  $K_{ATP}$  frente a cambios en la concentración de  $Rb^+$ , y la Tabla III-2 muestra el valor ajustado de sus coeficientes.

$$K_{ATP} = \frac{N_0 + N_1 [Rb^+] + N_2 [Rb^+]^2}{D_0 + D_1 [Rb^+] + [Rb^+]^2} \quad \text{Ecuación III-4}$$

**Tabla III-2.** Valores ajustados de los coeficientes de la Ecuación III-4.

Coeficiente	Valor $\pm$ E.S.	Unidades
$N_0$	$(2,96 \pm 0,71) \cdot 10^4$	$\mu M^3$
$N_1$	$(4,7 \pm 1,8) \cdot 10^3$	$\mu M^2$
$N_2$	$(1,28 \pm 0,39) \cdot 10^3$	$\mu M$
$D_0$	$(2,84 \pm 0,67) \cdot 10^4$	$\mu M^2$
$D_1$	$(3,7 \pm 1,8) \cdot 10^2$	$\mu M$

Los valores fueron obtenidos por ajuste de la Ecuación III-4 a los valores del parámetro  $K_{ATP}$  de la Ecuación III-1, y se informan acompañados por su error estándar.

El análisis de la Ecuación III-4 permite deducir que en los límites donde la concentración de  $Rb^+$  es cero o tiende a infinito,  $K_{ATP}$  tomará valores iguales a  $N_0/D_0$  ( $1,043 \pm 0,046 \mu M$ ) o  $N_2$  [ $(1,28 \pm 0,39) \cdot 10^3 \mu M$ ]. El hecho de que en ambos casos  $K_{ATP}$  posea una magnitud finita indica que tanto la enzima libre como la que posee sus dos sitios de unión a  $Rb^+$  ocupados tienen la capacidad de unir ATP. Basándonos en esto, podemos concluir que la independencia de  $Rb_{ocl,m\acute{a}x}$  respecto de la concentración de ATP, mostrada en la Figura III-2C, no puede ser explicada postulando que el nucleótido no puede unirse a la enzima, y por lo tanto ejercer su efecto, cuando la concentración de  $Rb^+$  es suficientemente elevada.

### ***Construcción y ajuste de un modelo que describe los resultados experimentales***

Hasta aquí se mostró cómo se modifica la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en la  $Na^+/K^+$ -ATPasa en condiciones de equilibrio, en respuesta a variaciones en las concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP, y se presentaron las ecuaciones empíricas que mejor describen esa dependencia. En esta sección se analizará la información que brindan dichos ajustes parciales, con base en la teoría que rige los sistemas en equilibrio termodinámico (ver anexo a este capítulo). El objetivo principal de dicho análisis será lograr representar el sistema estudiado mediante un modelo que posea la mínima cantidad de especies y de



reacciones necesarias para explicar, en conjunto, todos los resultados experimentales mostrados.

La variación de  $Rb_{ocl}$  en respuesta a cambios en la concentración de  $Rb^+$ , mostrada en las Figuras III-1 (Paneles C y D) y III-2 (Panel A), es bien descripta por un cociente de polinomios de segundo grado (ver Ecuación III-3 y comentario a la Ecuación III-2). En él, el denominador está conformado por un término independiente (1), un término lineal ( $D_1[Rb^+]$ ) y un término cuadrático ( $D_2[Rb^+]^2$ ), y el numerador sólo por un término lineal ( $N_1[Rb^+]$ ) y uno cuadrático ( $N_2[Rb^+]^2$ ). Por otra parte, el mejor ajuste a las curvas de  $Rb_{ocl}$  *versus* [ATP] (Paneles A y B de la Figura III-1) se obtuvo con funciones hiperbólicas decrecientes, las cuales presentan términos independientes o que dependen linealmente de la concentración de ATP (ver Ecuación III-1).

De acuerdo con la forma de estas ecuaciones y con lo expuesto en el anexo a este capítulo, puede deducirse que el sistema estudiado presenta las siguientes características una vez alcanzado el equilibrio:

- 1) existen formas de la enzima unidas a ninguno, a uno o a dos iones  $Rb^+$  (Ecuación III-3) y a ninguna o a una molécula de ATP (Ecuación III-1).
- 2) la enzima libre y las especies unidas a uno o a dos iones  $Rb^+$  son capaces de asociarse a ATP. Para entender esto último conviene recordar que  $Rb_{ocl,\infty}$  representa la cantidad de  $Rb^+$  ocluido cuando la concentración de ATP tiende a infinito, de lo que resulta que todos los sumandos de la ecuación que lo describe (III-3) deben corresponder a especies unidas al nucleótido.
- 3) tanto las especies unidas a uno como las unidas a dos iones  $Rb^+$ , estén asociadas o no a ATP, contribuyen a la señal medida (poseen  $Rb^+$  ocluido), ya que los *numeradores* de las ecuaciones empíricas contienen términos de primer y de segundo orden en  $[Rb^+]$ , e independientes o de primer orden en [ATP].

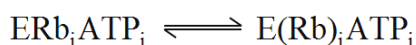
La función racional que se muestra a continuación describe la variación de  $Rb_{ocl}$  como función de las concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP en un sistema con las propiedades recién enumeradas:

$$Rb_{ocl} = \frac{N_{10}[Rb^+] + N_{20}[Rb^+]^2 + N_{11}[Rb^+][ATP] + N_{21}[Rb^+]^2[ATP]}{1 + D_{01}[ATP] + D_{10}[Rb^+] + D_{20}[Rb^+]^2 + D_{11}[Rb^+][ATP] + D_{21}[Rb^+]^2[ATP]}$$

Ecuación III-5

Puede verificarse que considerando constantes  $[Rb^+]$  o  $[ATP]$ , y operando algebraicamente, se obtienen expresiones análogas a las Ecuaciones III-1 y III-3.

Al analizar la Ecuación III-5 conviene recordar que la oclusión de  $Rb^+$  implica al menos dos pasos consecutivos: la *unión* del catión a sitios expuestos por la bomba, y su posterior *oclusión*, esto es, la transición a un estado en el cual el ion unido es inaccesible al medio de incubación que rodea la proteína (ver González-Lebrero *et al.*, 2002a). Por lo tanto, sería razonable pensar que existen formas de la enzima con  $Rb^+$  unido *pero no ocluido*, y formas con  $Rb^+$  unido y *ocluido*. La relación que existe entre las primeras y las segundas puede ser representada por la siguiente reacción:



donde  $ERb_iATP_j$  y  $E(Rb)_iATP_j$  corresponden a especies unidas a  $Rb^+$  y a ATP con una estequiometría dada por los subíndices “i” y “j” respectivamente, y los paréntesis en el producto indican que el  $Rb^+$  está ocluido. Dado que la técnica empleada sólo permite medir el  $Rb^+$  que se encuentra ocluido, sólo las segundas serán detectables.

Para identificar el *mínimo* número de especies necesario para describir adecuadamente los resultados experimentales, es preciso determinar si las formas enzimáticas donde el  $Rb^+$  está unido pero no ocluido se encuentran presentes en una concentración significativa. A continuación, se mostrará cómo esta información puede ser deducida operando con los coeficientes de la Ecuación III-5.

Cada término del denominador de la Ecuación III-5 representa una especie *macroscópicamente distinguible* del sistema, la cual podría englobar un conjunto de formas enzimáticas unidas a los mismos ligandos con igual estequiometría. El hecho de que exista, para cierto término del denominador, uno proporcional a él en el numerador indica que *al menos una* de las formas que aquél representa puede ser detectada, por lo que el  $Rb^+$  unido a ella *debe* estar ocluido. Como se demuestra en el anexo, la razón entre los coeficientes  $N_{ij}$  y  $D_{ij}$  de la Ecuación III-5 indica si, para cada uno de estos términos, las formas con  $Rb^+$  ocluido constituyen o no la totalidad de las formas por él representadas. Cuando la concentración de las formas con  $Rb^+$  unido pero no ocluido sea despreciable, este cociente tomará un valor igual al producto entre la concentración

total de enzima activa ( $E_T$ , aproximadamente 2,5 nmol/mg proteína) y el número “i” de iones Rb<sup>+</sup> en el complejo considerado.

Para obtener una estimación del valor de dichos cocientes se procedió a ajustar la Ecuación III-5 al conjunto de resultados experimentales. Los valores obtenidos para las relaciones  $N_{ij}/D_{ij}$  se muestran en la Tabla III-3.

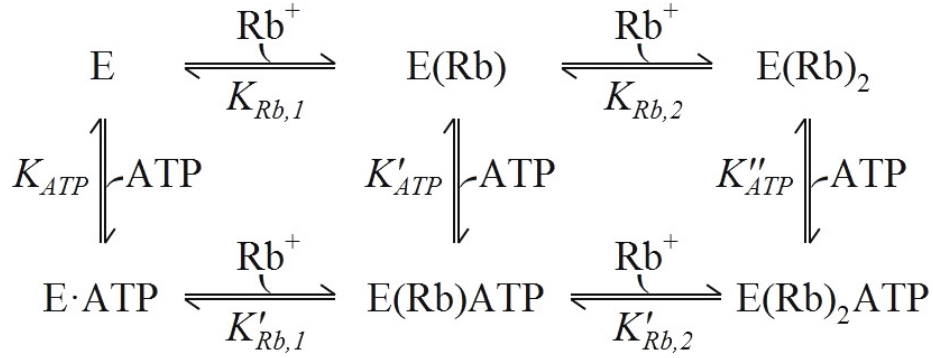
**Tabla III-3.** Cociente entre los valores ajustados de los coeficientes  $N_{ij}$  y  $D_{ij}$  de la Ecuación III-5.

$N_{ij}/D_{ij}$	Valor $\pm$ ES	Unidades
$N_{10}/D_{10}$	2,65 $\pm$ 0,40	nmol Rb <sup>+</sup> / mg prot
$N_{20}/D_{20}$	5,552 $\pm$ 0,020	nmol Rb <sup>+</sup> / mg prot
$N_{11}/D_{11}$	2,34 $\pm$ 0,80	nmol Rb <sup>+</sup> / mg prot
$N_{21}/D_{21}$	5,35 $\pm$ 0,30	nmol Rb <sup>+</sup> / mg prot

Los cocientes fueron calculados luego de ajustar la Ecuación III-5 a las medidas de Rb<sub>ocl</sub> que se muestran en la Figura III-1, y se informan acompañados por su error estándar. Para que el incremento de Rb<sub>ocl</sub> en ausencia de ATP fuese una función hiperbólica de [Rb<sup>+</sup>], el parámetro  $N_{20}$  fue calculado empleando la siguiente expresión:  $(N_{20})^2 = N_{10} (N_{20} D_{10} - N_{10} D_{20})$ .

Los valores de los cocientes  $N_{ij}/D_{ij}$  muestra que no son significativamente distintos del producto  $i \cdot E_T$ . De hecho, se obtiene una mejora significativa en base al criterio AICc si se repite el ajuste fijando la relación  $N_{ij} = i \cdot E_T D_{ij}$ , y ajustando los coeficientes  $D_{ij}$  y  $E_T$  (el mismo para todos los términos del numerador). Teniendo esto en cuenta es válido considerar que, una vez alcanzado el equilibrio, es despreciable la concentración de las formas en las cuales el Rb<sup>+</sup> unido no se encuentra ocluido.

Con esta información fue posible plantear un modelo mínimo que describiera las reacciones que vinculan en el equilibrio a la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa, el Rb<sup>+</sup> y el ATP (Esquema III-1). Este modelo es mínimo por cuanto sólo contiene especies macroscópicamente distinguibles cuya concentración no puede ser despreciada en las condiciones ensayadas. El número de especies es igual al número de términos presentes en el denominador de la Ecuación III-5 ya que no fue necesario suponer la existencia de especies con Rb<sup>+</sup> unido pero no ocluido.



**Esquema III-1.** Modelo mínimo que describe el equilibrio entre la  $Na^+/K^+$ -ATPasa,  $Rb^+$  y ATP cuando la oclusión de  $Rb^+$  ocurre a través de la ruta directa. Los paréntesis indican que el  $Rb^+$  se encuentra ocluido.  $K$  simboliza la constante aparente de disociación del ligando indicado en el subíndice.

La dependencia de  $Rb_{ocl}$  respecto de las concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP libres y de la concentración total de enzima activa está dada por la Ecuación III-6, obtenida resolviendo el sistema de ecuaciones que se desprende del Esquema III-1 para una condición de equilibrio.

$$Rb_{ocl} = \frac{\left( \frac{[Rb^+]}{K_{Rb,1}} + 2 \frac{[Rb^+]^2}{K_{Rb,1}K_{Rb,2}} + \frac{[Rb^+][ATP]}{K_{Rb,1}K'_{ATP}} + 2 \frac{[Rb^+]^2[ATP]}{K_{Rb,1}K'_{Rb,2}K'_{ATP}} \right) E_T}{1 + \frac{[ATP]}{K_{ATP}} + \frac{[Rb^+]}{K_{Rb,1}} + \frac{[Rb^+]^2}{K_{Rb,1}K_{Rb,2}} + \frac{[Rb^+][ATP]}{K_{Rb,1}K'_{ATP}} + \frac{[Rb^+]^2[ATP]}{K_{Rb,1}K'_{Rb,2}K'_{ATP}}} \quad \text{Ecuación III-6}$$

Debido a la existencia de caminos alternativos que conectan el mismo par de especies, la ecuación deducida puede contener diferentes (aunque equivalentes) combinaciones de las constantes de equilibrio incluidas en el esquema. El ajuste de los parámetros de la Ecuación III-6 a las medidas de  $Rb_{ocl}$  proporcionó los valores que figuran en la Tabla III-4. La Figura III-1, presentada al comienzo del capítulo, muestra en líneas punteadas los valores de  $Rb_{ocl}$  predichos por la Ecuación III-6 luego de asignar a sus parámetros los valores que brindaron el mejor ajuste.

**Tabla III-4.** Valores ajustados de los parámetros de la Ecuación III-6.

Parámetro	Valor $\pm$ E.S.	Unidades
$K_{Rb,1}$	$2,95 \pm 0,12$	$\mu\text{M}$
$K_{Rb,2}^{(*)}$	$11,81 \pm 0,50$	$\mu\text{M}$
$K'_{Rb,1}^{(\$)}$	$242,0 \pm 8,5$	$\mu\text{M}$
$K'_{Rb,2}$	$272 \pm 44$	$\mu\text{M}$
$K_{ATP}$	$0,890 \pm 0,065$	$\mu\text{M}$
$K'_{ATP}$	$72,9 \pm 4,5$	$\mu\text{M}$
$K''_{ATP}^{(\$)}$	$(1,68 \pm 0,26) \cdot 10^3$	$\mu\text{M}$
$E_T$	$2,793 \pm 0,031$	nmol / mg prot

Los valores fueron obtenidos por ajuste de la Ecuación III-6 a las medidas de  $Rb_{ocl}$  de la Figura III-1, y se informan acompañados por su error estándar.  $E_T$  es la concentración total de enzima activa expresada en nmol / mg de proteína. <sup>(\*)</sup> Para que el incremento de  $Rb_{ocl}$  en ausencia de ATP sea una función hiperbólica de  $[Rb^+]$ , durante el ajuste se mantuvo fija la relación  $K_{Rb,2} = 4 K_{Rb,1}$ . <sup>(\\$)</sup> La existencia de ciclos cerrados en el Esquema III-1 impone las siguientes restricciones termodinámicas:  $K'_{Rb,1} = K'_{ATP} K_{Rb,1} (K_{ATP})^{-1}$  y  $K''_{ATP} = K'_{Rb,2} K'_{ATP} (K_{Rb,2})^{-1}$ .

Las predicciones del modelo concuerdan bien con la información experimental. Cabe mencionar que las constantes de disociación ajustadas son constantes *aparentes* ya que vinculan especies que podrían presentar distintas conformaciones pero que resultan indistinguibles en este tipo de experimentos. Además, las constantes de disociación del  $Rb^+$  abarcan tanto la disociación del ion propiamente dicha como la reacción de exposición de los sitios de unión al medio de reacción (desoclusión) que debe precederla.

La constante de disociación del complejo entre el ATP y la enzima que no posee  $Rb^+$  ocluido ( $K_{ATP}$ ) se ubica en el rango submicromolar y es cerca de 2000 veces menor que la correspondiente al complejo  $E(Rb)_2ATP$  ( $K''_{ATP}$ ). Paralelamente, la disociación de los iones  $Rb^+$  está favorecida por la unión del nucleótido (comparar  $K_{Rb,1}$  y  $K_{Rb,2}$  con  $K'_{Rb,1}$  y  $K'_{Rb,2}$ ). El valor ajustado de  $E_T$  coincide aceptablemente con el calculado a partir de medidas de enzima fosforilada en estado estacionario ( $2,52 \pm 0,10$  nmol / mg proteína, ver más arriba).

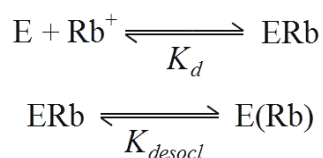
### ***Interpretación de los resultados experimentales***

En la sección anterior, con un acercamiento predominantemente empírico, se expuso un análisis de los resultados experimentales orientado a la construcción de un modelo mínimo que pudiera explicarlos satisfactoriamente. A continuación interpretaremos los resultados experimentales y el modelo formulado en el marco del conocimiento actual de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, a fin de extraer conclusiones acerca del funcionamiento de la enzima y su interacción con el  $\text{Rb}^+$  y el ATP.

#### ***Máxima cantidad de $\text{Rb}^+$ ocluido y constante aparente de disociación del $\text{Rb}^+$***

Como ya se dijo, cuando la concentración de  $\text{Rb}^+$  tiende a infinito, tanto en ausencia como en presencia de ATP,  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  tiende a un valor compatible con una estequiometría de dos moles de  $\text{Rb}^+$  por mol de enzima activa. Este valor coincide con la estequiometría observada en condiciones fisiológicas (Rossi y Nørby, 1993), y con modelos estructurales de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa basados en estudios cristalográficos que muestran sólo dos iones  $\text{Rb}^+$  ocluidos (Morth *et al.*, 2007; Shinoda *et al.*, 2009). Puede suponerse entonces que el máximo valor de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  obtenido corresponde a una máxima ocupación de los sitios de unión/oclusión.

Teniendo en cuenta que el proceso de oclusión es más complejo que la simple unión del catión a sitios expuestos por la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, la máxima ocupación de los sitios de oclusión en el equilibrio no es trivial. Se mencionó anteriormente que la oclusión de  $\text{Rb}^+$  implica al menos dos pasos: primero debe producirse la unión del catión a los sitios de transporte, y luego su oclusión. Esta secuencia está representada en el Esquema III-2, que para mayor claridad se limita a la oclusión de un solo  $\text{Rb}^+$ , aunque las conclusiones derivadas son válidas para la oclusión de dos iones y para la existencia de más de dos pasos.



Esquema III-2

En el esquema, “E” representa la enzima y los paréntesis indican que el Rb<sup>+</sup> se halla ocluido. Las constantes de disociación ( $K_d$ ) y de desoclusión ( $K_{desocl}$ ) están definidas por los siguientes cocientes de concentraciones en el equilibrio:

$$K_d = \frac{[E][Rb^+]}{[ERb]}$$

$$K_{desocl} = \frac{[ERb]}{[E(Rb)]}$$

De acuerdo con el Esquema III-2,  $Rb_{ocl}$  se relaciona con la concentración de Rb<sup>+</sup> a través de la siguiente ecuación:

$$Rb_{ocl} = \frac{\frac{E_T}{K_{desocl} + 1} [Rb^+]}{K_d \left( \frac{K_{desocl}}{K_{desocl} + 1} \right) + [Rb^+]} \quad \text{Ecuación III-7}$$

La Ecuación III-7 predice que  $Rb_{ocl}$  tomará valores entre cero y  $E_T/(K_{desocl} + 1)$  cuando la concentración de Rb<sup>+</sup> se incremente desde cero a infinito, a lo largo de una hipérbola de  $K_{0,5}$  igual a  $K_d K_{desocl} / (K_{desocl} + 1)$ . Se ve entonces que la cota superior de  $Rb_{ocl}$  será igual a  $E_T$ , y por lo tanto los sitios de oclusión estarán completamente ocupados, sólo cuando  $K_{desocl}$  tienda a cero, esto es, cuando la segunda reacción del Esquema III-2 esté desplazada prácticamente por completo hacia la forma E(Rb). Esto puede entenderse pensando que el grado de desplazamiento del paso que conduce a la oclusión depende exclusivamente de características propias del funcionamiento de la enzima. Así, un incremento de la concentración de Rb<sup>+</sup> puede llevar a saturar los sitios de unión, pero la fracción del Rb<sup>+</sup> unido que pase al estado ocluido depende sólo del valor de  $K_{desocl}$ . En el Esquema III-1 no están representadas especies con Rb<sup>+</sup> unido pero no ocluido, sugiriendo que los pasos que conducen a las especies con uno o dos iones Rb<sup>+</sup> unidos al estado ocluido (incluso aquéllas unidas a ATP) deben estar suficientemente favorecidos como para que, en el equilibrio, la fracción de Rb<sup>+</sup> unido que no está ocluido sea despreciable. Con base en lo recién discutido, esto condice con el hecho de que, en el equilibrio, los sitios de oclusión estén completamente ocupados.

Analicemos ahora el denominador de la Ecuación III-7. El valor de  $K_{0,5}$ , que da idea de la afinidad aparente de la enzima por el  $Rb^+$ , será tanto menor que la constante de disociación real ( $K_d$ ) cuanto menor sea  $K_{desocl}$ . En conclusión, puede observarse una afinidad aparente elevada para el incremento de  $Rb_{ocl}$  con el aumento de la concentración de  $Rb^+$  aun cuando la afinidad intrínseca de los sitios de unión sea baja. Es posible obtener un valor estimado de  $K_d$  igual a 2981  $\mu M$  a partir del modelo propuesto por González-Lebrero *et al.* (2002a) para explicar la cinética de oclusión y desoclusión de  $Rb^+$  en ausencia de ATP, presentado en la Introducción (Figura I-2). Asignando ese valor a  $K_d$  en la Ecuación III-7, y recordando que la  $K_{0,5}$  para el incremento de  $Rb_{ocl}$  con la concentración de  $Rb^+$  es de 5,80  $\mu M$  en ausencia de ATP, el valor de  $K_{desocl}$  debe ser cercano a  $2 \cdot 10^{-3}$ . Una constante de esta magnitud implicaría además que la cantidad máxima de  $Rb^+$  ocluido sea igual a  $0,998E_T$ , esto es, que en el esquema simplificado prácticamente todo el  $Rb^+$  unido se encuentre ocluido. Como puede verse, un valor pequeño de  $K_{desocl}$  permite explicar tanto la ocupación completa de los sitios de oclusión como la elevada afinidad aparente del incremento de  $Rb_{ocl}$  con la concentración de  $Rb^+$ .

*Forma de la curva de incremento de la cantidad de  $Rb^+$  ocluido como función de la concentración de  $Rb^+$*

Varios autores han observado que el incremento de la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en ausencia de ATP se relaciona hiperbólicamente con la concentración de  $Rb^+$  en el medio de incubación (Shani *et al.*, 1987; Forbush, 1987a; Esmann, 1994; González-Lebrero *et al.*, 2002a,b; Montes *et al.*, 2004). Este es un hecho llamativo teniendo en cuenta que:

- 1) durante el proceso se ocluyen dos iones  $Rb^+$ , por lo cual sería esperable la observación de una curva más compleja que una hipérbola equilátera, y
- 2) cuando los estados con  $Rb^+$  ocluido se forman a través de la ruta fisiológica de oclusión se obtienen curvas sigmoides (Kaufman *et al.*, 1999).

Para explicar esta aparente inconsistencia, se expuso anteriormente que el cociente de polinomios que describe una función sigmoide (como la Ecuación III-3) puede ser simplificado para obtener la ecuación de una hipérbola (como la III-2) si se cumple



cierta relación entre sus coeficientes. A continuación intentaremos dar una interpretación física a esa relación.

La relación entre  $Rb_{ocl}$  y la concentración de  $Rb^+$  en medios de reacción sin ATP puede ser hallada igualando  $[ATP]$  a cero en la Ecuación III-6, deducida a partir del modelo del Esquema III-1. Al hacer esto, dicha ecuación se reduce a:

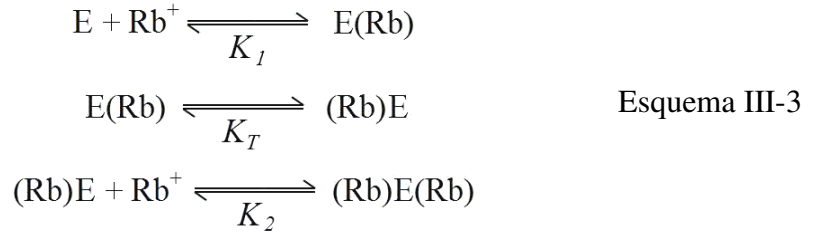
$$Rb_{ocl} = \frac{\left( \frac{[Rb^+]}{K_{Rb,1}} + 2 \frac{[Rb^+]^2}{K_{Rb,1} K_{Rb,2}} \right) E_T}{1 + \frac{[Rb^+]}{K_{Rb,1}} + \frac{[Rb^+]^2}{K_{Rb,1} K_{Rb,2}}} \quad \text{Ecuación III-8}$$

Si se cumple que  $K_{Rb,2} = 4K_{Rb,1}$ , lo que implica que los sitios de unión se comportan como si fueran idénticos y no interactuantes, esta ecuación describirá una hipérbola equilátera con una  $K_{0,5}$  igual a  $2K_{Rb,1}$ :

$$Rb_{ocl} = \frac{2 [Rb^+] E_T}{2K_{Rb,1} + [Rb^+]} \quad \text{Ecuación III-9}$$

Para entender cómo se interpreta la condición  $K_{Rb,2} = 4K_{Rb,1}$  basándonos en el conocimiento actual sobre el funcionamiento de la  $Na^+/K^+$ -ATPasa, recordemos que los estudios del curso en el tiempo de la desoclusión de  $Rb^+$  y del intercambio  $^{86}Rb^+/Rb^+$  sugieren que el intercambio entre el  $Rb^+$  ocluido y el libre ocurre de manera *ordenada* y *secuencial* (ver Introducción). Según un modelo propuesto en nuestro laboratorio (González-Lebrero *et al.*, 2002a), mostrado en la Figura I-2 de la Introducción, los sitios de unión/oclusión se dispondrían en “fila india”, pudiendo sólo uno de ellos ser expuesto al medio de incubación. En este sitio ocurriría la oclusión de un primer ion  $Rb^+$ , que debe luego traslocarse al otro sitio para permitir la oclusión de un segundo ion.

Esquemáticamente, el proceso puede ser representado de la siguiente forma:



En el esquema, “E” representa la enzima, los sitios de unión/oclusión se disponen a izquierda y derecha, siendo este último el que puede ser expuesto al medio de incubación.  $K_I$  y  $K_2$  son las constantes aparentes de disociación del primer y del segundo ion ocluido, respectivamente, y  $K_T$  la constante de equilibrio del paso de traslocación del  $Rb^+$  desde el sitio de la izquierda al de la derecha.  $K_I$  y  $K_2$  son constantes aparentes ya que engloban tanto la exposición del sitio al medio de reacción como la disociación del catión propiamente dicha. Es importante notar que esta secuencia de reacciones no contradice la secuencia presentada en la mitad superior del modelo del Esquema III-1, que muestra las reacciones que tienen lugar en el equilibrio en ausencia de ATP. Aquí sólo se muestran dos estados *microscópicos* sugeridos por estudios cinéticos,  $E(Rb)$  y  $(Rb)E$ , que resultan indistinguibles en experimentos en equilibrio y por lo tanto son englobados por la especie *macroscópicamente distinguishable* “ $E(Rb)$ ” del Esquema III-1. De hecho, las constantes  $K_{Rb,1}$  y  $K_{Rb,2}$  de dicho esquema pueden expresarse como función de  $K_I$ ,  $K_2$  y  $K_T$  del Esquema III-3:

$$K_{Rb,1} = \frac{K_I K_T}{1 + K_T} \quad \text{Ecuación III-10}$$

$$K_{Rb,2} = K_2 (1 + K_T) \quad \text{Ecuación III-11}$$

En el modelo del Esquema III-3, la cantidad de  $Rb^+$  ocluido está representada por la suma  $[E(Rb)] + [(Rb)E] + 2 [(Rb)E(Rb)]$ , y la función que la relaciona con la concentración del catión es:

$$Rb_{ocl} = \frac{\left( \frac{[Rb^+](1 + K_T)}{K_1 K_T} + 2 \frac{[Rb^+]^2}{K_1 K_2 K_T} \right) E_T}{1 + \frac{[Rb^+](1 + K_T)}{K_1 K_T} + \frac{[Rb^+]^2}{K_1 K_2 K_T}} \quad \text{Ecuación III-12}$$

Puede demostrarse que si  $K_1 = K_2$  (la afinidad del sitio más expuesto es independiente de la ocupación del otro) y  $K_T = 1$  (en el equilibrio, el único ion ocluido tiene igual probabilidad de estar ocupando uno u otro sitio) la representación gráfica de la Ecuación III-12 es una hipérbola equilátera definida por:

$$Rb_{ocl} = \frac{2 [Rb^+] E_T}{K_1 + [Rb^+]}$$

Si tenemos en cuenta las funciones que relacionan a  $K_1$ ,  $K_2$  y  $K_T$  con  $K_{Rb,1}$  y  $K_{Rb,2}$  (Ecuaciones III-10 y III-11) los requisitos  $K_1 = K_2$  y  $K_T = 1$  se traducen en la restricción  $K_{Rb,2} = 4K_{Rb,1}$ .

En presencia de ATP, la afinidad aparente por el Rb<sup>+</sup> decrece. Esto se manifiesta en el mayor valor que arrojó el ajuste de las constantes aparentes de disociación del Rb<sup>+</sup> ( $K'_{Rb,1}$  y  $K'_{Rb,2}$  en el Esquema III-1) en comparación con las obtenidas en ausencia ATP ( $K_{Rb,1}$  y  $K_{Rb,2}$ , respectivamente, ver Tabla III-4). Por lo dicho en la sección anterior (“Máxima cantidad de Rb<sup>+</sup> ocluido y constante aparente de disociación del Rb<sup>+</sup>”) esa menor afinidad aparente puede tener su origen en una menor afinidad intrínseca de los sitios de unión y/o en un desfavorecimiento del cambio conformacional que lleva a la oclusión del Rb<sup>+</sup> unido. En este último caso, sin embargo, debe cumplirse que la reacción de oclusión continúe estando suficientemente desplazada hacia las formas ocluidas como para permitir que la concentración de las especies con Rb<sup>+</sup> unido pero no ocluido sea despreciable. Nuestros resultados sugieren (ver Capítulos IV y V) que la modificación principal se da sobre el cambio conformacional, observándose un incremento de la velocidad de desoclusión y una disminución de la de oclusión.

---

# ANEXO AL CAPÍTULO III

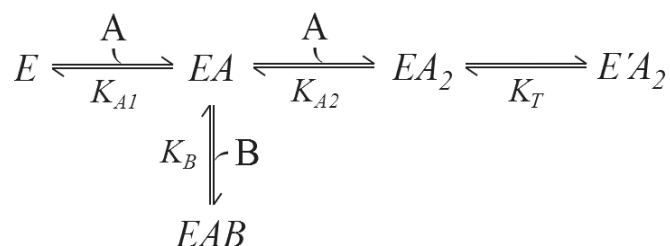
## *Estudio de sistemas en equilibrio termodinámico*

El objetivo de este apartado es exponer brevemente:

- 1) Cómo la composición de un sistema en equilibrio termodinámico se asocia con la forma de las ecuaciones que permiten calcular la concentración de las especies que lo constituyen.
- 2) Qué información proveen las ecuaciones empíricas que describen cierto sistema en equilibrio acerca de su composición.

### *I. Relación entre la composición de un sistema en condiciones de equilibrio y las ecuaciones que lo describen*

En un sistema constituido por una macromolécula y sus ligandos en equilibrio termodinámico, la relación entre la concentración de cada uno de los complejos formados y la concentración de los ligandos está definida por un cociente de polinomios. Para analizar la forma que adquiere ese cociente utilizaremos el Esquema III'-1 a modo de ejemplo:



Esquema III'-1

Allí se representa una macromolécula (E) que puede unir una o dos moléculas de un ligando “A”, originando los complejos EA y EA<sub>2</sub>, y una de otro ligando “B” sólo cuando se encuentra formando el complejo EA. A su vez, el complejo EA<sub>2</sub> puede sufrir un cambio conformacional reversible que origina la especie E'A<sub>2</sub>. Las constantes  $K_{A1}$ ,  $K_{A2}$  y  $K_B$  representan las constantes de equilibrio para la disociación del ligando A de EA y de EA<sub>2</sub>, y de B de EAB, respectivamente, mientras que  $K_T$  representa la constante de equilibrio del cambio conformacional que convierte E'A<sub>2</sub> en EA<sub>2</sub>. Estas constantes están definidas por las siguientes expresiones:

$$K_{A1} = \frac{[E][A]}{[EA]} \quad K_B = \frac{[EA][B]}{[EAB]}$$

$$K_{A2} = \frac{[EA][A]}{[EA_2]} \quad K_T = \frac{[EA_2]}{[E'A_2]}$$

Las reacciones caracterizadas por las constantes  $K_{A1}$ ,  $K_{A2}$  y  $K_B$  implican la unión de algún ligando, por lo que las especies que vinculan pueden ser diferenciadas por la naturaleza o el número de ligandos que tienen unidos. Diremos que esas especies son *macroscópicamente distinguibles*. En cambio, los complejos EA<sub>2</sub> y E'A<sub>2</sub> *no* lo son por no cumplir con esa condición, sino que son dos conformaciones en que puede existir la especie macroscópicamente distinguible que llamaremos (EA<sub>2</sub>)<sub>Σ</sub>. La relevancia de esta clasificación será clara más adelante.

Pasemos ahora a analizar dos situaciones que podrían plantearse al estudiar este sistema.

### *Situación 1:*

Supongamos primero que para el estudio del sistema descripto se dispone de una técnica de medición que permite detectar solamente las especies que tienen unido A pero no B (esto es, las especies EA, EA<sub>2</sub> y E'A<sub>2</sub>) y que la señal medida ( $S$ ) es proporcional a la concentración de A que está formando parte de esos complejos:

$$S = \theta \{ [EA] + 2([EA_2] + [E'A_2]) \} \quad \text{Ecuación III'-1}$$

La constante de proporcionalidad  $\theta$  equivale al nivel de señal que genera una concentración de A *unido* unitaria. A partir de la definición de las constantes de equilibrio y de la siguiente ecuación de balance de masa para la macromolécula:

$$E_T = [E] + [EA] + [EAB] + [EA_2] + [E'A_2]$$

puede deducirse una ecuación que relaciona  $[EA]$ ,  $[EA_2]$  y  $[E'A_2]$ , y por lo tanto  $S$ , con las concentraciones de A, de B y con las constantes de equilibrio del sistema. La forma que adquiere la expresión para  $S$  es:

$$S = \frac{N_{10}[A] + N_{20}[A]^2}{D_{00} + D_{10}[A] + D_{11}[A][B] + D_{20}[A]^2} \quad \text{Ecuación III'-2}$$

siendo el significado de los coeficientes  $N_{ij}$  y  $D_{ij}$ :

$$\begin{aligned} N_{10} &= \theta E_T K_{A2} K_B K_T & D_{10} &= K_{A2} K_B K_T \\ N_{20} &= 2\theta E_T K_B (K_T + 1) & D_{11} &= K_{A2} K_T \\ D_{00} &= K_{A1} K_{A2} K_B K_T & D_{20} &= K_B (K_T + 1) \end{aligned}$$

En la Ecuación III'-2 tanto el numerador como el denominador son funciones polinómicas de la concentración en equilibrio de los ligandos libres, y cada coeficiente es una combinación de constantes de equilibrio. Cada término del *denominador* representa una especie macroscópicamente distinguible del sistema, y en cada uno de ellos, el exponente al que aparece elevado cada ligando corresponde al número de moléculas de ese ligando presentes en la especie representada. Puede verse entonces que aparece:

- 1) un término independiente que representa la macromolécula libre E;
- 2) un término que depende de  $[A]$  que representa el complejo EA;
- 3) un término que depende de  $[A]$  y de  $[B]$  que representa el complejo EAB;
- 4) un término que depende de  $[A]^2$  que representa la *suma* de los complejos  $EA_2$  y  $E'A_2$ , los cuales, como dijimos anteriormente, no son macroscópicamente distinguibles y son englobados por la especie  $(EA_2)_\Sigma$ .

En el caso del *numerador*, aparece un término por cada una de las especies macroscópicamente distinguibles que es *detectada*, siendo estos términos proporcionales a los que corresponden a esa especie en el denominador. Así, están representados los complejos EA y  $(EA_2)_\Sigma$ , pero no E o EAB.

Explicamos arriba que todos los términos revelan la existencia de especies macroscópicamente distinguibles, las cuales pueden presentar distintas conformaciones o estados “*microscópicos*”. Las razones  $N_{ij}/D_{ij}$  permiten deducir qué *fracción* de esos estados puede ser *detectado*. En nuestro ejemplo:

$$\frac{N_{10}}{D_{10}} = \theta E_T \frac{K_{A2} K_B K_T}{K_{A2} K_B K_T}$$

$$\frac{N_{20}}{D_{20}} = 2 \theta E_T \frac{K_B (K_T + 1)}{K_B (K_T + 1)}$$

Estos cocientes pueden ser interpretados como el producto de dos factores:

$$\frac{N_{ij}}{D_{ij}} = \varepsilon_{ij} \cdot \phi_{ij}$$

El primero indica la magnitud de la señal que se obtendría si la concentración de la especie asociada a esos coeficientes fuese igual a  $E_T$ :  $\theta E_T$  para EA y  $2 \theta E_T$  para  $(EA_2)_\Sigma$ .

El segundo,  $\phi_{ij}$ , es un cociente de constantes de equilibrio que puede tomar valores entre 0 y 1 e indica la fracción de los estados microscópicos representados que es detectada.

Puede verse que tanto  $\phi_{10}$  como  $\phi_{20}$  son iguales a uno. Esto es coincidente con la premisa de que el 100% de EA y de  $(EA_2)_\Sigma$  puede ser detectado. En base a esto, no podría descartarse que EA y  $(EA_2)_\Sigma$  presenten distintos estados microscópicos, pero permite afirmar que de existir, todos son detectados.

*Situación 2:*

Al igual que antes, sólo puede detectarse el ligando A, pero únicamente cuando forma parte del complejo E'A<sub>2</sub>. La señal medida puede ser expresada ahora como:

$$S = 2\theta[E'A_2] \quad \text{Ecuación III'-3}$$

Y si expresamos  $S$  como función de  $[A]$ ,  $[B]$ ,  $E_T$  y las constantes de equilibrio del sistema se obtiene:

$$S = \frac{N'_{20} [A]^2}{D_{00} + D_{10} [A] + D_{11} [A][B] + D_{20} [A]^2} \quad \text{Ecuación III'-4}$$

El denominador es idéntico al de la Ecuación III'-2 ya que no hubo modificaciones en el modelo. En cambio, en el numerador aparece un solo término dado que la única especie macroscópicamente distinguible que puede ser detectada es (EA<sub>2</sub>)<sub>Σ</sub>. El coeficiente  $N'_{20}$  equivale a  $2\theta K_B E_T$  y el cálculo de  $N'_{20}/D_{20}$  da como resultado:

$$\frac{N'_{20}}{D_{20}} = 2\theta E_T \frac{K_B}{K_B(K_T + 1)} = 2\theta E_T \frac{1}{K_T + 1}$$

En este caso, el factor  $\phi_{20}$  es menor a uno. Esto refleja que sólo una fracción de (EA<sub>2</sub>)<sub>Σ</sub>, igual a  $1/(K_T + 1)$ , puede ser detectada: aquélla representada por el complejo E'A<sub>2</sub>. De hecho, puede demostrarse que:

$$\frac{1}{K_T + 1} = \frac{E'A_2}{(EA_2)_\Sigma} = \frac{E'A_2}{E'A_2 + EA_2}$$

Teniendo esto en cuenta, puede concluirse que aún cuando la concentración de A tienda a infinito y la concentración de (EA<sub>2</sub>)<sub>Σ</sub> tienda a  $E_T$ , la señal medida será *menor* que  $2\theta E_T$ , excepto en el caso en que  $K_T$  tenga un valor tan inferior a 1 (esto es, que el



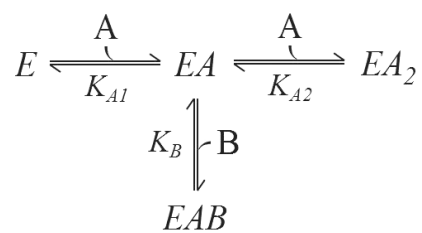
equilibrio entre  $EA_2$  y  $E'A_2$  esté tan desplazado hacia esta última especie) que  $1/(K_T + 1)$  tienda a 1.

## ***II. Formulación de un modelo mínimo a partir de las ecuaciones empíricas que describen un sistema en condiciones de equilibrio***

Cuando se estudia un sistema en condiciones de equilibrio el camino suele ser inverso al planteado en los ejemplos anteriores: a partir de una o más señales se deducen ecuaciones racionales que relacionan dichas señales con la concentración de los ligandos libres a través de coeficientes empíricos (en los ejemplos,  $N_{ij}$  y  $D_{ij}$ ), cuyo valor se obtiene por ajuste de las ecuaciones a la información experimental. La forma de esas ecuaciones y el valor de los coeficientes aportan elementos para deducir la composición del sistema. En base a los ejemplos analizados, puede concluirse que:

- 1) cada sumando presente en el *denominador* de las ecuaciones empíricas revelará la existencia de una especie macroscópicamente distinguible unida a tantos ligandos como lo indique el exponente al que están elevadas sus concentraciones. Cada una de estas especies podría en principio englobar un *conjunto* de estados microscópicos que contienen el mismo número de los mismos ligandos, como en el caso de  $(EA_2)_\Sigma$  de los ejemplos.
- 2) el *numerador* tendrá tantos términos como sea el número de especies macroscópicamente distinguibles que son detectadas.
- 3) la razón entre los coeficientes del numerador y del denominador asociados a la misma especie indicarán qué fracción de esa especie es detectada. De ser menores a uno y mayores a cero, permitirán suponer que esa especie existe en *al menos* dos estados microscópicos distintos, diferenciados uno del otro por el hecho de que uno es detectado y el otro no.

De esta manera, si el estudio de cierto sistema bajo las condiciones propuestas en la *situación 2* permitiera deducir una ecuación como la Ecuación III'-4, sería posible a partir de ella plantear un modelo mínimo igual al del Esquema III'-1 (luego de obtener el mejor ajuste de los coeficientes  $N_{ij}$  y  $D_{ij}$ ). En cambio, la técnica de medición empleada en la *situación 1* no permitiría llegar a ese modelo y sólo sería posible plantear el siguiente modelo mínimo:



dado que, al ser detectadas tanto  $EA_2$  como  $E'A_2$ , las medidas sólo prueban la existencia de una única especie con dos moléculas de A unidas, que es detectada en su totalidad.



---

## CAPÍTULO IV

### *Efectos del $Rb^+$ y del ATP sobre la cinética de oclusión de $Rb^+$ a través de la ruta directa*

En este capítulo se analizará cómo evoluciona en el tiempo la aparición de especies con  $Rb^+$  ocluido, y cuáles son las modificaciones que el ATP induce en ese proceso. Se ha probado que el ATP genera una disminución de los niveles de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio (Capítulo III en esta tesis; González-Lebrero *et al.*, 2002b), y que acelera la transición de las formas enzimáticas con  $K^+$  o  $Rb^+$  ocluidos hacia la conformación  $E_1$ , promoviendo de esta manera la desoclusión del catión (ver Introducción). Resulta entonces de interés evaluar si el efecto del ATP sobre el equilibrio entre el  $Rb^+$  libre y el ocluido responde sólo a esta promoción de la desoclusión, o si también ejerce algún efecto sobre su reacción inversa, esto es, sobre la oclusión de  $Rb^+$  a través de la ruta directa. Conviene recordar que existe evidencia contradictoria en torno a este interrogante: Steinberg y Karlish (1989) no detectaron ningún efecto significativo del ATP sobre la constante observada de oclusión, mientras que Hasenauer *et al.* (1993) reportaron una aceleración de la oclusión inducida por el ATP en medios de reacción a 4 °C. Posteriormente, Montes *et al.* (2004) encontraron que la sonda fluorescente eosina-Y, que puede unirse al mismo sitio que el ATP y que influye de manera similar al nucleótido sobre la velocidad de desoclusión y los niveles de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio, causaba una disminución de la velocidad de oclusión de  $Rb^+$ . Los experimentos que presentaremos a continuación fueron realizados con el propósito de aclarar el efecto ejercido por el ATP sobre la cinética de oclusión de  $Rb^+$  a través de la ruta directa, desde los primeros instantes de la reacción hasta alcanzado el equilibrio.

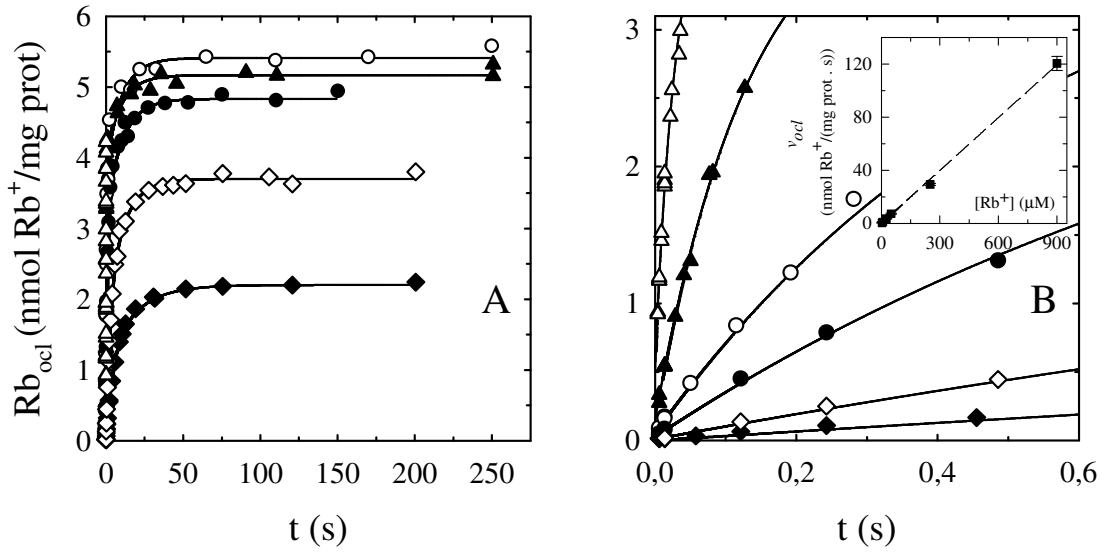
### ***I. Curso en el tiempo de la oclusión de $Rb^+$ en ausencia de ATP***

Para estudiar la cinética de formación de los intermediarios con  $Rb^+$  ocluido, se incubó la  $Na^+/K^+$ -ATPasa con  $RbCl$  (marcado como  $^{86}RbCl$ ) a 25 °C durante diferentes periodos de tiempo comprendidos entre 0 y 250 segundos. Transcurrido el tiempo de incubación deseado, se detuvo la reacción y se determinó la cantidad de  $Rb^+$  ocluido como se detalla en Materiales y Métodos. La Figura IV-1 muestra la cantidad de  $Rb^+$  ocluido obtenida como función del tiempo de incubación cuando se emplearon concentraciones de  $Rb^+$  entre 3 y 900  $\mu M$ . En este último caso, sólo se siguió la evolución de  $Rb_{ocl}$  durante los primeros 129 milisegundos de reacción y no se obtuvieron medidas correspondientes al estado de equilibrio.

Las curvas presentadas en la Figura IV-1 muestran que la cantidad de  $Rb^+$  ocluido alcanza el equilibrio en un proceso bifásico, que no presenta un periodo de inducción a tiempos cercanos a cero (Panel B). Esto último sugiere que las reacciones que preceden a la oclusión son mucho más rápidas que la oclusión en sí.

También puede apreciarse que para tiempos de incubación suficientemente largos las medidas tienden a un valor que aumenta con la concentración de  $Rb^+$  y que coincide, dentro del error experimental, con la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio predicha por el modelo III-1 del Capítulo III.

En el Panel B se ve que la velocidad inicial de oclusión aumenta al incrementarse la concentración de  $Rb^+$  en el medio de reacción. Este efecto se observa claramente en el gráfico inserto donde se muestran los valores de la velocidad de oclusión extrapolados a  $t = 0$  ( $v_{ocl}$ ) como función de la concentración del catión. La relación entre  $v_{ocl}$  y la concentración de  $Rb^+$  es prácticamente lineal.



**Figura IV-1.** Cantidad de  $Rb^+$  ocluido a través de la ruta directa como función del tiempo. La oclusión tuvo lugar en medios de reacción que contenían una concentración de  $Rb^+$  de 3 ( $\blacklozenge$ ), 7 ( $\diamond$ ), 25 ( $\bullet$ ), 50 ( $\circ$ ), 250 ( $\blacktriangle$ ) o 900 ( $\triangle$ )  $\mu M$ . Los resultados correspondientes a una concentración de  $Rb^+$  de 900  $\mu M$  sólo se extienden hasta un tiempo de incubación de 129 milisegundos, por lo que es difícil apreciarlos en el Panel A. El Panel B es un detalle de las medidas obtenidas empleando tiempos de incubación menores que 0,6 segundos. Las líneas de trazo continuo son la representación de las Ecuaciones IV-1 o IV-2 (sólo para 900  $\mu M$   $Rb^+$ ) resueltas con los parámetros que permitieron obtener el mejor ajuste a cada serie de resultados. El gráfico inserto en el Panel B muestra la velocidad de oclusión extrapolada a tiempo cero ( $v_{ocl}$ ) como función de la concentración de  $Rb^+$ . La línea de trazo discontinuo corresponde al mejor ajuste de la función  $v_{ocl} = m[Rb^+]$ , que proporcionó para “ $m$ ” un valor de  $0,1328 \pm 0,0019$  nmol  $Rb^+$ /(mg prot · s ·  $\mu M$ ).

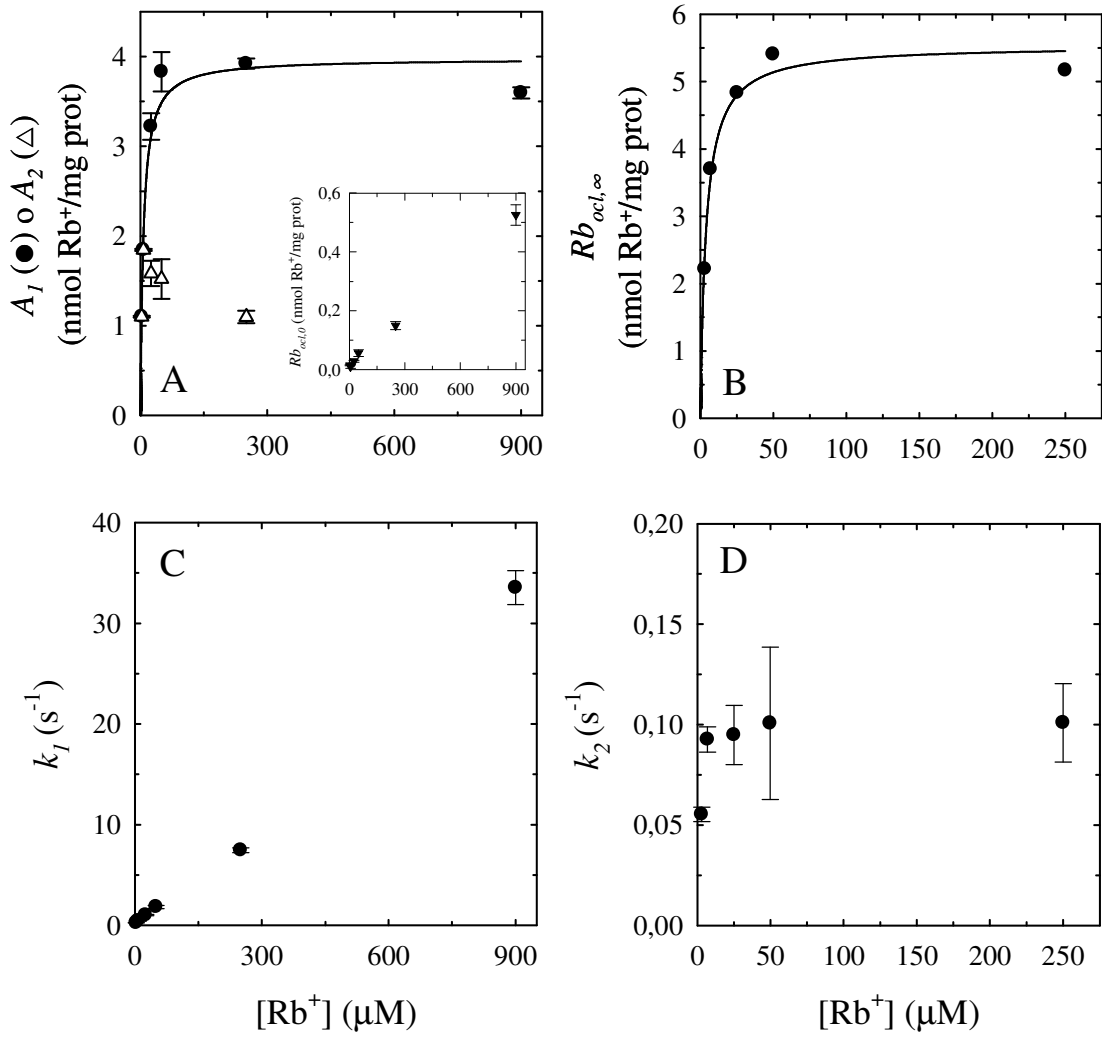
La mejor descripción del incremento de  $Rb_{ocl}$  con el tiempo, en base al criterio AICc, se obtuvo con la suma de dos funciones exponenciales crecientes y un término constante (Ecuación IV-1), excepto en el experimento correspondiente a una concentración de  $Rb^+$  de 900  $\mu M$ , donde el mejor ajuste se obtuvo con la Ecuación IV-2 debido al acotado intervalo de tiempos evaluado:

$$Rb_{ocl} = Rb_{ocl,0} + A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{Ecuación IV-1}$$

$$Rb_{ocl} = Rb_{ocl,0} + A_1(1 - e^{-k_1 t}) \quad \text{Ecuación IV-2}$$

Los parámetros  $A_1$  y  $A_2$  representan las amplitudes de cada una de las fases de oclusión,  $k_1$  y  $k_2$  sus coeficientes aparentes de velocidad y  $Rb_{ocl,0}$  la cantidad de  $Rb^+$  ocluido extrapolada a tiempo cero. Dado que la enzima se hallaba suspendida en un medio libre de  $^{86}Rb^+$  antes de ser incubada con el catión, se esperaría que al tender el tiempo a cero,  $Rb_{ocl}$  tendiese también a cero, y por lo tanto que la incorporación del parámetro  $Rb_{ocl,0}$  fuese innecesaria. Sin embargo, la inclusión de dicho término condujo a una mejora significativa del ajuste a los resultados experimentales en base al criterio AICc. La necesidad de incluir un coeficiente independiente del tiempo sugiere la existencia de una fase adicional de oclusión cuya velocidad es tan elevada que se completa en un tiempo menor al menor tiempo de incubación evaluado (4 ms al emplear 900  $\mu M$   $Rb^+$ , 6 ms para el resto de las condiciones). En nuestro laboratorio ya se ha reportado la existencia de una fase de oclusión con estas características al estudiar la oclusión de  $Rb^+$  a través de la ruta directa, ya sea empleando esta misma técnica (González-Lebrero *et al.*, 2002a) o analizando el cambio en el tiempo de la fluorescencia emitida por una sonda unida no covalentemente a la enzima (Montes *et al.*, 2006). Es importante aclarar que un experimento control ya mencionado (ver Materiales y Métodos: “*Blancos en las medidas de  $Rb^+$  ocluido*”) permite descartar como posible origen de ese término a una unión inespecífica del  $^{86}Rb^+$  no contemplada en los blancos de reacción. Además, es posible obtener evidencias de la existencia de esa fase temprana de oclusión en presencia de ATP, debido a su menor velocidad (secciones II y III de este capítulo).

El ajuste de las Ecuaciones IV-1 y IV-2 a los resultados proporcionó los valores de los parámetros que se muestran en la Figura IV-2 como función de la concentración de  $Rb^+$ . En el Panel B se grafica además la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio ( $Rb_{ocl,\infty}$ ), estimada como el valor límite que toma la Ecuación IV-1 cuando el tiempo tiende a infinito ( $Rb_{ocl,0} + A_1 + A_2$ ).



**Figura IV-2.** Dependencia respecto de la concentración de  $Rb^+$  de los parámetros de las Ecuaciones IV-1 y IV-2 que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados de la Figura IV-1. Dado que la Ecuación IV-2, que fue ajustada al experimento correspondiente a 900  $\mu M$   $Rb^+$ , no contiene los parámetros  $A_2$  y  $k_2$ , sólo  $Rb_{oci,0}$ ,  $A_1$  y  $k_1$  presentan valores para esa concentración de  $Rb^+$ . Las barras verticales indican  $\pm 1$  error estándar estimado.  $Rb_{oci,\infty}$  (Panel B) representa la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio y fue calculado como  $Rb_{oci,0} + A_1 + A_2$ . Las líneas de trazo continuo son la representación de la Ecuación IV-3, cuyos parámetros fueron reemplazados por los valores informados en la Tabla IV-1.

Puede apreciarse en el Panel A que el incremento de la concentración de  $Rb^+$  fue acompañado por un aumento de la amplitud de la fase rápida ( $A_1$ ), mientras que en el caso de  $A_2$  se observó un incremento sólo cuando se emplearon las menores concentraciones de  $Rb^+$ . Concentraciones de  $Rb^+$  superiores a 7  $\mu M$  estuvieron



asociadas a una disminución progresiva del valor ajustado de  $A_2$ , siendo  $A_1$  responsable de la mayor parte del incremento de  $Rb_{ocl}$ .  $A_1$  y  $Rb_{ocl,\infty}$  (Panel B) aumentaron de manera hiperbólica al incrementarse la concentración de  $Rb^+$ . Para caracterizar esa dependencia se empleó la siguiente función:

$$P = \frac{P_{\infty} [Rb^+]}{K_{0,5} + [Rb^+]} \quad \text{Ecuación IV-3}$$

donde P representa a  $A_1$  o a  $Rb_{ocl,\infty}$ ,  $P_{\infty}$  al valor que toma P cuando  $[Rb^+]$  tiende a infinito, y  $K_{0,5}$  indica la concentración de  $Rb^+$  con la que se observa la mitad del cambio máximo en P. El ajuste de esta ecuación a los valores de  $A_1$  y de  $Rb_{ocl,\infty}$  proporcionó los resultados informados en la Tabla IV-1. Resulta interesante que el valor de  $K_{0,5}$  para el incremento de  $A_1$  o de  $Rb_{ocl,\infty}$  con la concentración de  $Rb^+$  resultó comparable al obtenido para la curva de  $Rb_{ocl}$  en el equilibrio *versus*  $[Rb^+]$  en medios carentes de ATP, informado en el Capítulo III ( $5,80 \pm 0,39 \mu\text{M}$ ).

**Tabla IV-1.** Valores de los parámetros de la Ecuación IV-3 ajustada a los valores de  $A_1$  y de  $Rb_{ocl,\infty}$  de la Figura IV-2.

	$A_1$	$Rb_{ocl,\infty}$	
Parámetro	Valor $\pm$ E.S.	Valor $\pm$ E.S.	Unidades
$P_{\infty}$	$3,98 \pm 0,18$	$5,54 \pm 0,20$	nmol $Rb^+$ /mg prot
$K_{0,5}$	$7,0 \pm 1,5$	$3,88 \pm 0,70$	$\mu\text{M}$

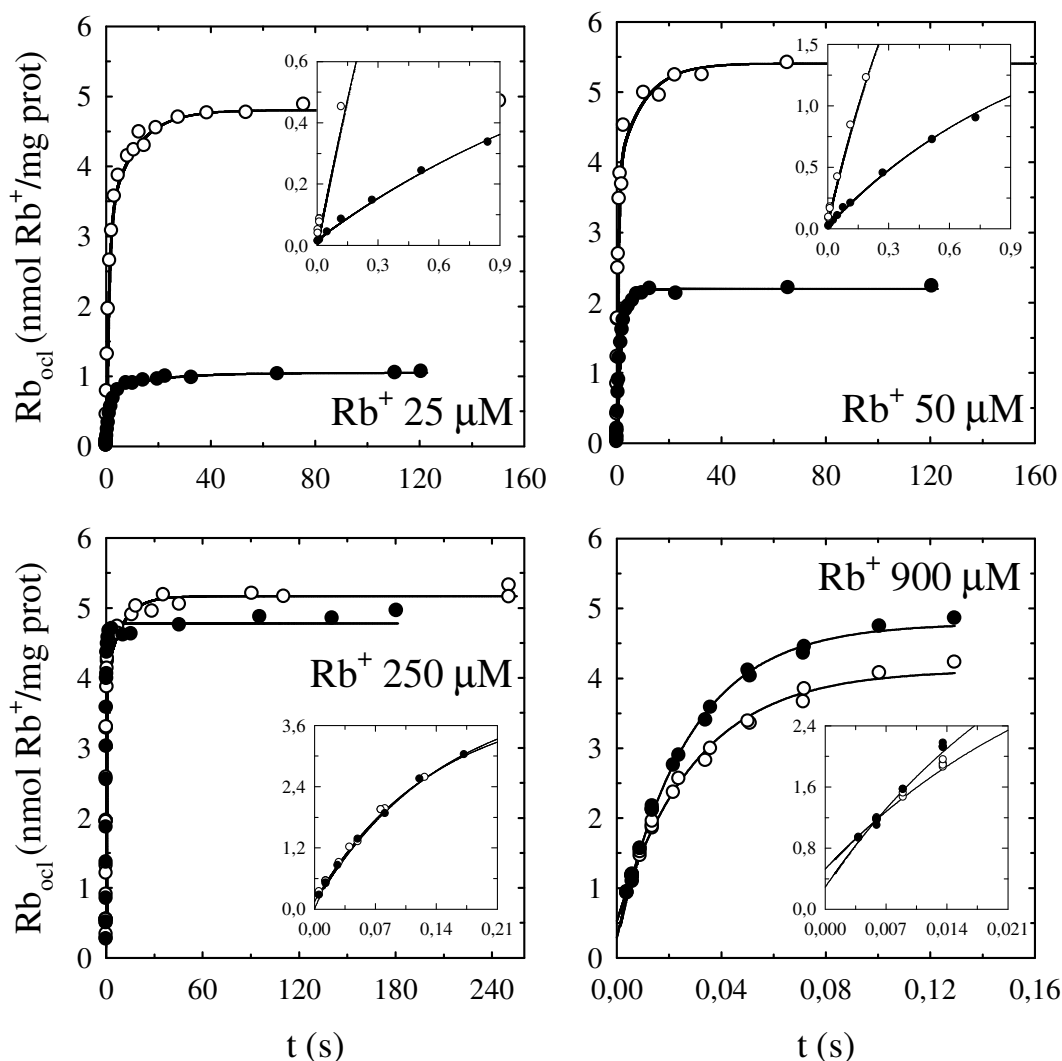
Los valores fueron obtenidos por ajuste de la Ecuación IV-3 a los valores de  $A_1$  y de  $Rb_{ocl,\infty}$  mostrados en la Figura IV-2, y se informan acompañados por su error estándar (E.S.).

Los valores ajustados de  $Rb_{ocl,0}$  (gráfico inserto en el Panel A de la Figura IV-2) permiten calcular que en ningún caso este parámetro representó más del 10% de la máxima cantidad de  $Rb^+$  ocluido medida. El  $Rb^+$  promovería el incremento de  $Rb_{ocl,0}$  con una afinidad aparente menor que en el caso de  $A_1$  o  $Rb_{ocl,\infty}$ , ya que a diferencia de estos últimos,  $Rb_{ocl,0}$  parece estar lejos de alcanzar un *plateau* aún con una concentración de  $Rb^+$  de  $900 \mu\text{M}$ .

En los Paneles C y D puede observarse que los valores del coeficiente aparente de velocidad  $k_1$  son significativamente mayores que los de  $k_2$ , y parecen aumentar linealmente con la concentración de  $Rb^+$ . Por el contrario, no se observa una marcada variación de  $k_2$  en el intervalo de concentraciones estudiado. La evolución de ambos parámetros está de acuerdo con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (González-Lebrero *et al.*, 2002a).

## ***II. Curso en el tiempo de la oclusión de $Rb^+$ en presencia de 200 $\mu M$ ATP***

Para estudiar los cambios que se producen en la cinética de oclusión de  $Rb^+$  como consecuencia de la presencia de ATP, se incubó en primera instancia la enzima con el nucleótido en una concentración de 200  $\mu M$  durante 15 minutos a fin de lograr que se alcanzara el equilibrio entre el ATP unido y el libre. Esta concentración de ATP fue elegida porque, como se mostrará más adelante (sección IV: “*Efectos del ATP sobre la velocidad inicial de oclusión de  $Rb^+$* ”), permite observar el cambio máximo en la velocidad de oclusión de  $Rb^+$ , sin ser evidentes efectos debidos al incremento de la fuerza iónica del medio de reacción. Posteriormente, la suspensión se mezcló con igual volumen de una solución que contenía cantidad suficiente de ATP y  $^{86}RbCl$  para que las concentraciones finales fueran de 200  $\mu M$  ATP y 25, 50, 250 o 900  $\mu M$   $^{86}Rb^+$ . A partir de ese momento se determinó la cantidad de  $Rb^+$  ocluido como función del tiempo transcurrido, y los resultados se muestran con símbolos llenos en la Figura IV-3. Cuando se empleó una concentración de  $Rb^+$  de 900  $\mu M$ , sólo se siguió la evolución de la cantidad de  $Rb^+$  ocluido durante los primeros 129 milisegundos de reacción. Con fines comparativos, se grafican también en la Figura IV-3 (símbolos vacíos) las medidas obtenidas al emplear la misma concentración de  $Rb^+$  en ausencia de ATP, las cuales fueron tomadas de la Figura IV-1.



**Figura IV-3.** Cantidad de  $Rb^+$  ocluido a través de la ruta directa como función del tiempo. La oclusión tuvo lugar en medios de reacción que contenían una concentración de ATP de 0 (símbolos vacíos) o 200  $\mu M$  (símbolos llenos) y la concentración de  $Rb^+$  indicada en cada panel. Los gráficos insertos muestran un detalle de los resultados correspondientes a las incubaciones más breves. Las líneas de trazo continuo son la representación de la Ecuación IV-4 (25, 50 o 250  $\mu M$   $Rb^+$ ) o IV-2 (900  $\mu M$   $Rb^+$ ) calculadas con los parámetros que permitieron obtener el mejor ajuste a cada serie de resultados.

Los resultados mostrados en los primeros tres paneles permiten verificar que, en concordancia con los resultados del Capítulo III, cuando el tiempo tiende a infinito las medidas tienden a un valor menor en presencia de ATP, que coincide con las predicciones del modelo III-1.

Es notable que la presencia de ATP en el medio de reacción produzca efectos contrapuestos en la velocidad de oclusión de  $Rb^+$  dependiendo de la concentración del catión ensayada (ver gráficos insertos en la Figura IV-3 y Panel F de la Figura IV-4). Se observa que cuando el medio de incubación contiene concentraciones de  $Rb^+$  menores, mayores o iguales a 250  $\mu M$ , el ATP genera una disminución, un aumento, o no modifica dicha velocidad.

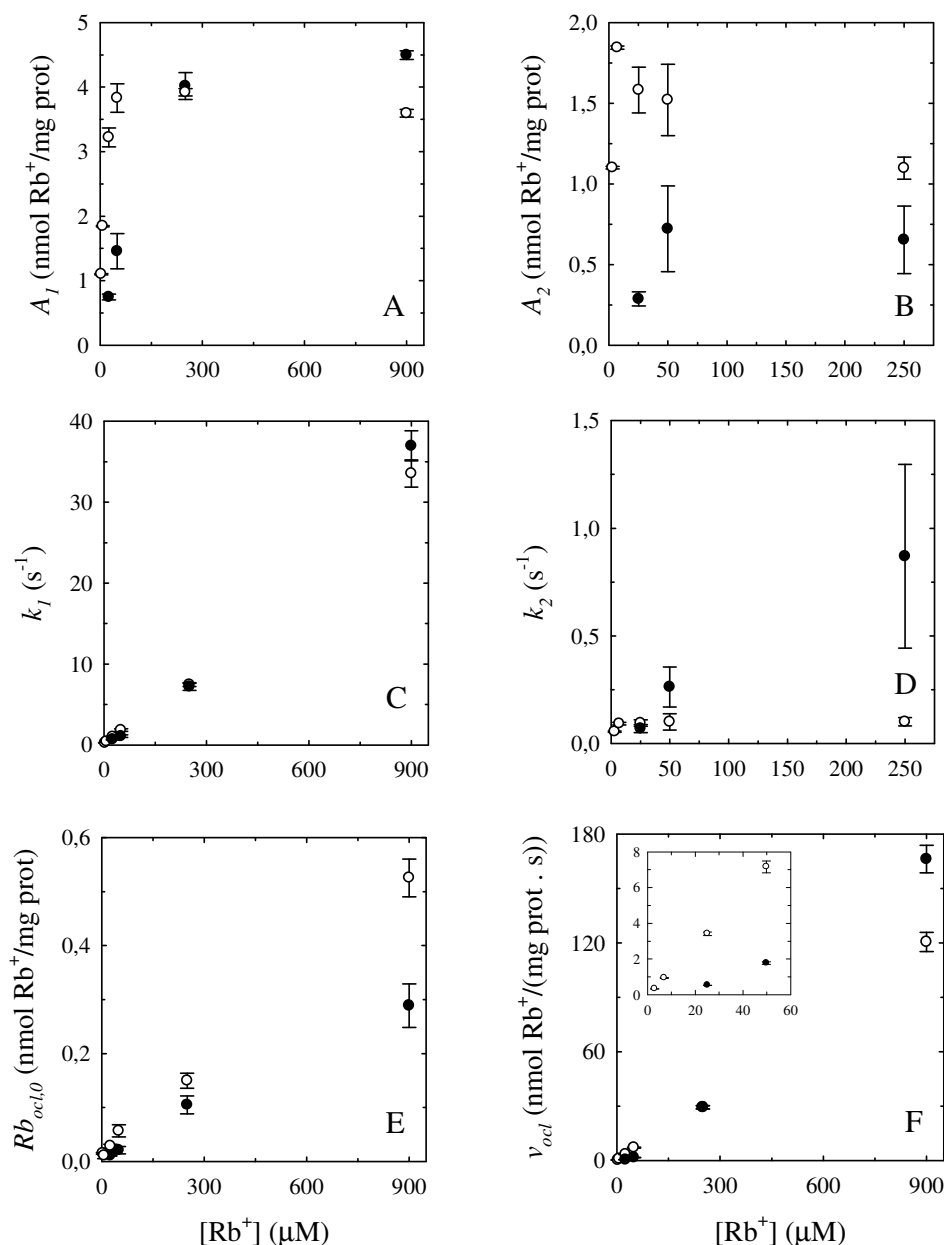
De acuerdo con el criterio AICc, la función que mejor describió la evolución temporal de  $Rb_{ocl}$  cuando se utilizaron concentraciones de  $Rb^+$  de 25, 50 o 250  $\mu M$ , en presencia de ATP, fue la suma de tres funciones exponenciales crecientes:

$$Rb_{ocl} = Rb_{ocl,0}(1 - e^{-k_0 t}) + A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{Ecuación IV-4}$$

Los parámetros  $Rb_{ocl,0}$ ,  $A_1$  y  $A_2$  representan las amplitudes de cada una de las fases de oclusión, y  $k_0$ ,  $k_1$  y  $k_2$  sus coeficientes aparentes de velocidad. Debido al menor intervalo de tiempos estudiado, se ajustó a las medidas correspondientes a 900  $\mu M$   $Rb^+$  la suma de una función exponencial creciente y un término independiente (Ecuación IV-2).

El ajuste de la Ecuación IV-4 proporcionó para el parámetro  $k_0$  valores de  $100 \pm 29 \text{ s}^{-1}$  (25  $\mu M$   $Rb^+$ ),  $94 \pm 55 \text{ s}^{-1}$  (50  $\mu M$   $Rb^+$ ) y  $213 \pm 138 \text{ s}^{-1}$  (250  $\mu M$   $Rb^+$ ). Teniendo en cuenta estos valores, la primera fase de la Ecuación IV-4 representaría una fase de oclusión muy rápida, que correspondería al proceso que se observaba ya completo en experimentos realizados en ausencia de ATP y asociado al parámetro  $Rb_{ocl,0}$  de las Ecuaciones IV-1 y IV-2 (ver sección anterior). En presencia de 900  $\mu M$   $Rb^+$ , la fase muy rápida de oclusión se completaría antes del menor tiempo de incubación empleado (4 ms), por lo que su existencia sólo se evidencia por la presencia de una ordenada al origen en la función ajustada ( $Rb_{ocl,0}$ ).

En la Figura IV-4 están graficados con símbolos llenos, como función de la concentración de  $Rb^+$ , los valores del resto de los parámetros de las Ecuaciones IV-2 y IV-4 que permitieron obtener el mejor ajuste a los resultados de la Figura IV-3. A su vez, en el Panel F se muestra la velocidad inicial de oclusión de  $Rb^+$ . Ésta, para poder ser comparada con la obtenida en ausencia de ATP, fue calculada sin considerar la pequeña fase muy rápida de oclusión.



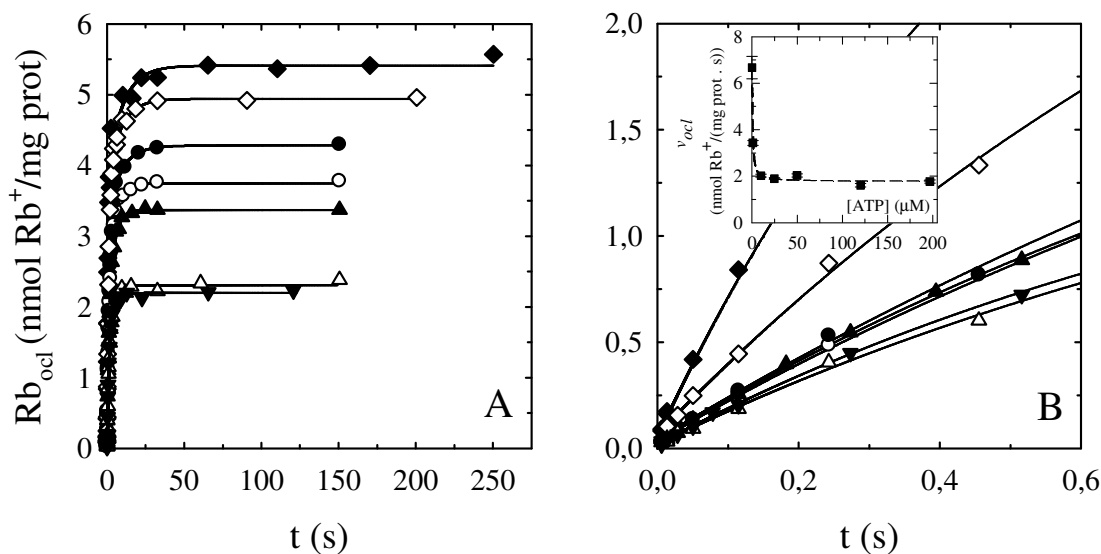
**Figura IV-4.** Paneles A – E: Valores de los parámetros de las Ecuaciones IV-2 y IV-4 que proporcionaron el mejor ajuste a las medidas de  $Rb_{occl}$  en presencia de ATP de la Figura IV-3, como función de  $[Rb^+]$  (símbolos llenos). Los valores representados con símbolos vacíos corresponden a experimentos realizados en ausencia de ATP, tomados de la Figura IV-1. Dado que la Ecuación IV-2, empleada para ajustar los experimentos correspondientes a 900  $\mu M$   $Rb^+$ , no contiene los parámetros  $A_2$  y  $k_2$ , éstos no presentan valores para esa concentración de  $Rb^+$ . **Panel F:** Valores de  $v_{ocl}$  calculados para medios de reacción libres de ATP (símbolos vacíos) o con una concentración de ATP igual a 200  $\mu M$  (símbolos llenos). El gráfico inserto muestra los valores correspondientes a las menores concentraciones de  $Rb^+$ . En todos los paneles las barras verticales indican  $\pm 1$  error estándar estimado.

En presencia de ATP, los valores de  $Rb_{ocl,0}$  y  $A_1$  aumentaron al aumentar la concentración de  $Rb^+$  en todo el intervalo estudiado, en tanto que los de  $A_2$  primero aumentan y luego parecen hacerse constantes o incluso decrecer ligeramente cuando la concentración del catión es superior a 50  $\mu M$ . En todas las condiciones ensayadas  $A_1$  resultó mayor que  $A_2$ . Los valores de  $Rb_{ocl,0}$  muestran que el ATP induce una disminución de la amplitud de la fase inicial muy rápida de oclusión. Si se comparan los resultados obtenidos en presencia (símbolos llenos) y en ausencia de ATP (símbolos vacíos), se aprecia que los cambios en  $A_1$  y  $A_2$  requieren mayores concentraciones de  $Rb^+$  cuando los experimentos se llevan a cabo en presencia del nucleótido. Esto es consistente con una menor afinidad aparente de la enzima por el catión inducida por el ATP, ya sugerida por los experimentos del Capítulo III.

Los valores de  $k_1$  obtenidos en medios de reacción con ATP aumentaron con el incremento de la concentración de  $Rb^+$  y no mostraron diferencias marcadas con respecto a los obtenidos en ausencia del nucleótido. En el caso de  $k_2$ , mientras que en ausencia de ATP su valor prácticamente no se modifica al aumentar la concentración de  $Rb^+$ , en presencia de ATP se observa un incremento marcado, alcanzándose además valores superiores a los registrados en medios de incubación carentes de ATP.

### ***III. Curso en el tiempo de la oclusión de $Rb^+$ en presencia de distintas concentraciones de ATP***

Los experimentos que se presentan a continuación fueron realizados con el fin de estimar la afinidad aparente con que el ATP modula la oclusión de  $Rb^+$  a través de la ruta directa. Para llevarlos a cabo, se incubó la enzima con la concentración de ATP que se deseaba evaluar durante 15 minutos, a fin de lograr que se alcanzara el equilibrio entre el ATP libre y el unido. Posteriormente, un volumen de esta suspensión se mezcló con otro igual de una solución que contenía cantidad suficiente de ATP y  $^{86}RbCl$  para mantener constante la concentración del primero y lograr una concentración final de  $^{86}Rb^+$  de 50  $\mu M$ . A partir de ese momento se determinó la cantidad de  $Rb^+$  ocluido como función del tiempo transcurrido. Los resultados se muestran en la Figura IV-5.



**Figura IV-5.** Cantidad de  $Rb^+$  ocluido como función del tiempo, en presencia de diferentes concentraciones de ATP. La oclusión tuvo lugar en medios de reacción que contenían 50  $\mu M$   $Rb^+$  y 0 ( $\blacklozenge$ ), 1 ( $\diamond$ ), 10 ( $\bullet$ ), 25 ( $\circ$ ), 50 ( $\blacktriangle$ ), 120 ( $\triangle$ ) o 200 ( $\blacktriangledown$ )  $\mu M$  ATP. El Panel B detalla las medidas correspondientes a tiempos de incubación menores que 0,6 segundos. En el gráfico inserto se informa la velocidad inicial de oclusión de  $Rb^+$  calculada para cada concentración de ATP estudiada. Las líneas de trazo continuo son la representación de la Ecuación IV-1 (ausencia de ATP) o de la IV-4, calculadas con los parámetros que permitieron obtener el mejor ajuste a cada serie de resultados. La línea discontinua corresponde a la Ecuación IV-5 luego de reemplazar sus parámetros por aquéllos que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados.

Los resultados permiten apreciar que el incremento de la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en función del tiempo describe al menos dos fases. Puede verificarse también una disminución inducida por el ATP en la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio, que concuerda con los resultados analizados en el Capítulo III. El gráfico inserto en el Panel B permite ver que el ATP induce una disminución de  $v_{ocl}$  (como se había mostrado en el Panel F de la figura IV-4) y que esa disminución es bien descripta por la siguiente función hiperbólica de la concentración del nucleótido (representada por la línea discontinua):

$$P = \frac{P_0 K_{0,5} + P_\infty [Rb^+]}{K_{0,5} + [Rb^+]} \quad \text{Ecuación IV-5}$$

donde  $P_0$  y  $P_\infty$  representan el valor que toma  $v_{ocl}$  cuando la concentración de ATP es cero o tiende a infinito, y  $K_{0,5}$  la concentración del nucleótido necesaria para producir la mitad del cambio máximo en  $v_{ocl}$ . El ajuste de esta ecuación proporcionó los siguientes valores para sus parámetros:  $P_0 = 6,67 \pm 0,14$  nmol  $Rb^+$ /(mg prot·s),  $P_\infty = 1,778 \pm 0,067$  nmol  $Rb^+$ /(mg prot·s) y  $K_{0,5} = 0,522 \pm 0,075$   $\mu$ M.

Al igual que las medidas obtenidas empleando una concentración de ATP de 200  $\mu$ M presentadas en la sección anterior, aquéllas mostradas en la figura IV-5 y obtenidas en presencia de ATP permitieron distinguir una fase muy rápida de oclusión, y la suma de tres funciones exponenciales crecientes (Ecuación IV-4) fue la que proporcionó el mejor ajuste a estos resultados. Por otro lado, se empleó la suma de dos funciones exponenciales crecientes y un término constante (Ecuación IV-1) para describir los resultados obtenidos en ausencia del nucleótido. La evolución de los parámetros de las Ecuaciones IV-1 y IV-4 frente a cambios en la concentración de ATP se presenta en la Figura IV-6.

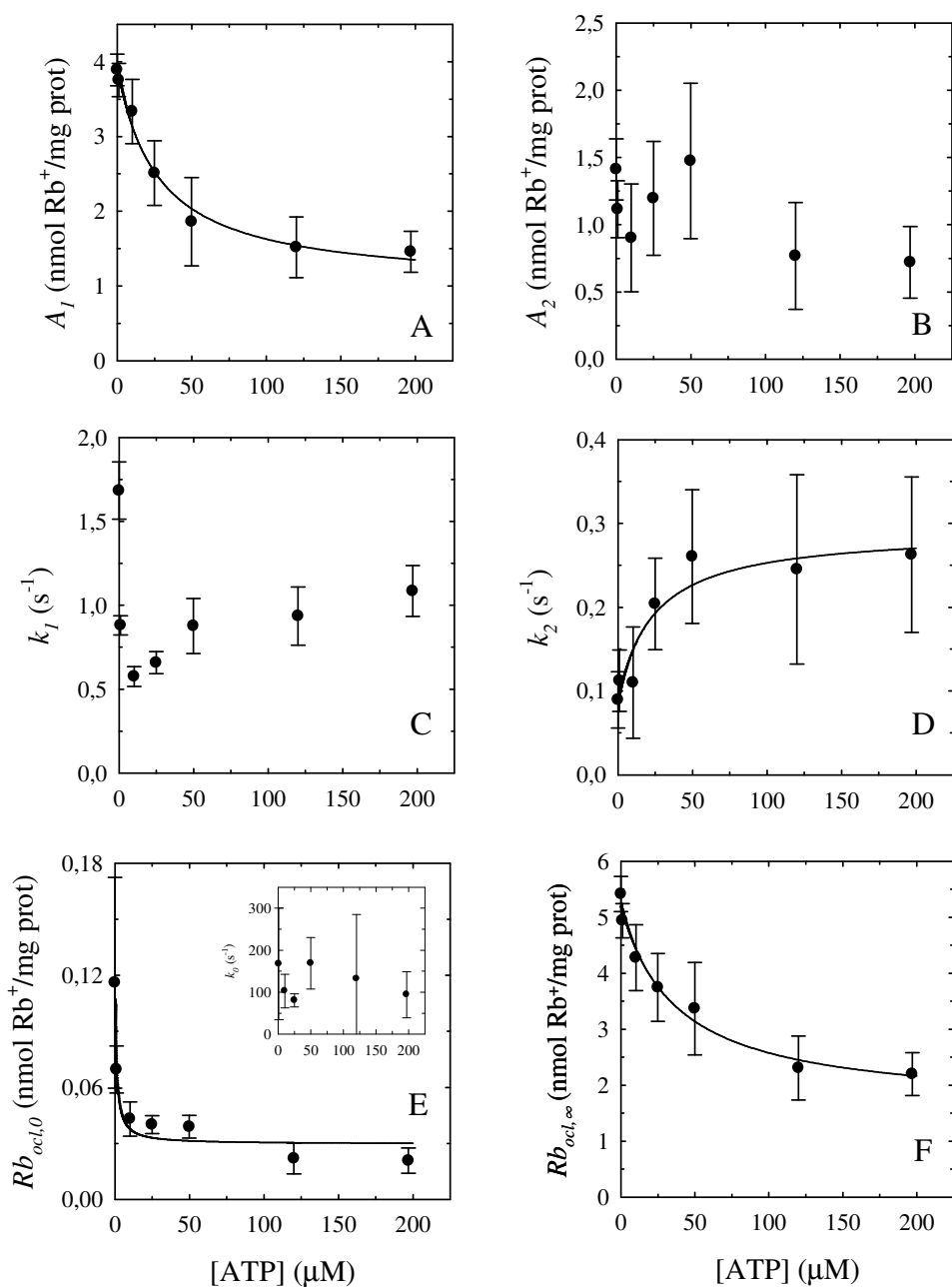
Los parámetros  $A_1$  y  $Rb_{ocl,0}$ , así como  $Rb_{ocl,\infty}$ , decrecen con el aumento de la concentración de ATP. Se observa además que se requieren menores concentraciones del nucleótido para producir la mitad del cambio máximo en  $Rb_{ocl,0}$  que en  $A_1$  o  $Rb_{ocl,\infty}$ . El ajuste de la hipérbola equilátera mostrada anteriormente como Ecuación IV-5 a  $Rb_{ocl,0}$ ,  $A_1$  y  $Rb_{ocl,\infty}$  proporcionó los valores que se muestran en la Tabla IV-2.

**Tabla IV-2.** Valores de los parámetros de la Ecuación IV-5 que proporcionaron el mejor ajuste a  $Rb_{ocl,0}$ ,  $A_1$ ,  $Rb_{ocl,\infty}$  y  $k_2$  de la Figura IV-6.

Parámetro	$Rb_{ocl,0}$	$A_1$	$Rb_{ocl,\infty}$	$k_2$
	Valor $\pm$ E.S	Valor $\pm$ E.S.	Valor $\pm$ E.S.	Valor $\pm$ E.S.
$P_0$	$0,1153 \pm 0,0087$ nmol $Rb^+$ /(mg prot)	$3,92 \pm 0,11$ nmol $Rb^+$ /(mg prot)	$5,20 \pm 0,15$ nmol $Rb^+$ /(mg prot)	$0,089 \pm 0,021$ $s^{-1}$
$P_\infty$	$0,0296 \pm 0,0044$ nmol $Rb^+$ /(mg prot)	$1,00 \pm 0,19$ nmol $Rb^+$ /(mg prot)	$1,59 \pm 0,33$ nmol $Rb^+$ /(mg prot)	$0,292 \pm 0,035$ $s^{-1}$
$K_{0,5}$	$1,02 \pm 0,48$ $\mu$ M	$27,5 \pm 6,9$ $\mu$ M	$37,6 \pm 12$ $\mu$ M	$24 \pm 16$ $\mu$ M

Los valores fueron obtenidos por ajuste de la Ecuación IV-5 a los valores de  $Rb_{ocl,0}$ ,  $A_1$ ,  $Rb_{ocl,\infty}$  (igual a  $Rb_{ocl,0} + A_1 + A_2$ ) y  $k_2$  mostrados en la Figura IV-6. "E.S." representa el error estándar estimado del parámetro informado.





**Figura IV-6.** Dependencia respecto de la concentración de ATP de los parámetros de las Ecuaciones IV-1 y IV-4 que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados de la figura IV-5. Las barras verticales indican  $\pm 1$  error estándar estimado.  $Rb_{ocl,\infty}$  representa la cantidad de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio y fue calculado como  $Rb_{ocl,0} + A_1 + A_2$ , y su error fue propagado a partir del error de estos parámetros. Las líneas de trazo continuo son la representación de la Ecuación IV-5, cuyos parámetros fueron reemplazados por los valores informados en la Tabla IV-2.

Al inspeccionar la Tabla IV-2, puede verse que se obtuvieron valores similares de  $K_{0,5}$  para la variación con la concentración de ATP de  $A_1$ ,  $Rb_{ocl,\infty}$  y  $k_2$  (ver más adelante), mientras que el valor obtenido en el caso de  $Rb_{ocl,0}$  es comparable al que se obtuvo anteriormente para la disminución de  $v_{ocl}$  ( $0,522 \pm 0,075 \mu M$ ).

El cambio de los valores de  $A_2$  con modificaciones en la concentración de ATP es poco marcado y se encuentra dentro del error experimental, por lo que su análisis resulta difícil. Al estudiar los valores obtenidos para  $Rb_{ocl,0}$ ,  $A_1$  y  $A_2$  se ve que la disminución del nivel de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio ( $Rb_{ocl,\infty}$ ) sería consecuencia principalmente de una disminución en la cantidad del catión que es ocluido durante la fase rápida.

El coeficiente aparente de velocidad  $k_1$  presenta una dependencia compleja respecto de la concentración de ATP. Al aumentar la concentración de ATP los valores de  $k_1$  disminuyen, alcanzan un mínimo, y luego aumentan y tienden a un valor inferior al obtenido en ausencia del nucleótido. La afinidad aparente con que el ATP induce la disminución de  $k_1$  parece similar a aquella observada para la disminución de  $v_{ocl}$  (comparar con la Figura IV-5, gráfico inserto en el Panel B).

Se puede observar también que el ATP causa un incremento en el coeficiente de velocidad  $k_2$ . Éste pudo ser bien descrito por una hipérbola equilátera (Ecuación IV-5), de cuyo ajuste resultaron los valores informados en la Tabla IV-2.

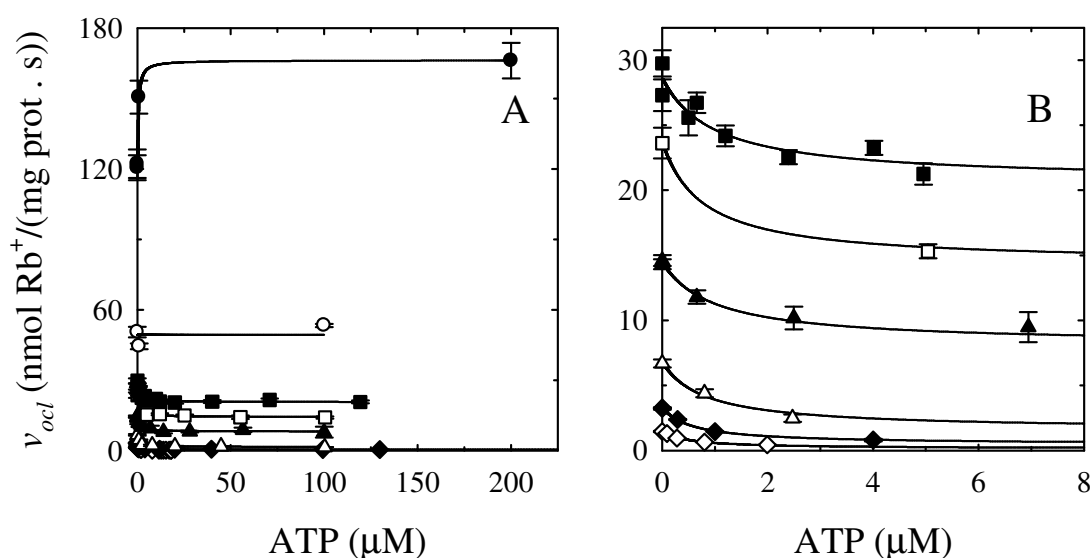
#### ***IV. Efectos del ATP sobre la velocidad inicial de oclusión de $Rb^+$***

Los resultados analizados hasta aquí mostraron que (1) el ATP puede inducir un incremento o una disminución de  $v_{ocl}$  dependiendo de la concentración de  $Rb^+$  presente en el medio de reacción (Figura IV-4, Panel F), y (2) en presencia de  $50 \mu M Rb^+$ , al aumentar la concentración de ATP se observa una disminución hiperbólica de  $v_{ocl}$  con elevada afinidad aparente ( $K_{0,5} = 0,522 \pm 0,075 \mu M$ ). Para estudiar más profundamente la magnitud de las variaciones de  $v_{ocl}$ , y la afinidad aparente con que el ATP ejerce estos cambios, se calculó  $v_{ocl}$  empleando medios de incubación con diferentes concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP.

El cálculo de  $v_{ocl}$  fue explicado en detalle en Materiales y Métodos (“Cálculo de la velocidad inicial de oclusión de  $Rb^+$ ”). Brevemente, se determinó la cantidad de  $Rb^+$  ocluido como función del tiempo en medios de reacción con las concentraciones

deseadas de  $Rb^+$  y de ATP. En general, se emplearon tiempos de incubación entre 4 y 200 milisegundos para incrementar la cantidad de condiciones evaluadas en un mismo experimento, obteniéndose la porción inicial de curvas como las mostradas a lo largo de este capítulo, y se ajustó a estos resultados una función empírica adecuada. El valor de  $v_{ocl}$  surgió como la solución para  $t = 0$  de la primera derivada respecto del tiempo ( $t$ ) de la función empírica ajustada. Debe tenerse en cuenta que en ningún caso se consideró para el cálculo de  $v_{ocl}$  la primera fase muy rápida de oclusión, ya que no siempre pudo ser correctamente caracterizada.

La Figura IV-7 muestra cómo varía  $v_{ocl}$  al incrementarse la concentración de ATP, en medios de incubación con una concentración de  $Rb^+$  comprendida entre 10 y 900  $\mu M$ .



**Figura IV-7.** Velocidad inicial de oclusión de  $Rb^+$  como función de la concentración de ATP. La oclusión tuvo lugar en medios de reacción que contenían una concentración de  $Rb^+$  de 10 ( $\diamond$ ), 25 ( $\blacklozenge$ ), 53 ( $\triangle$ ), 128 ( $\blacktriangle$ ), 189 ( $\square$ ), 250 ( $\blacksquare$ ), 499 ( $\circ$ ) o 900 ( $\bullet$ )  $\mu M$ . El Panel B muestra los resultados correspondientes a las menores concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP. Las líneas de trazo continuo son la representación de la Ecuación IV-6 calculada con los parámetros que permitieron obtener el mejor ajuste a la correspondiente serie de resultados. Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar estimado.

La figura confirma los resultados mostrados previamente:  $v_{ocl}$  decrece al aumentar la concentración de ATP cuando la concentración de  $Rb^+$  es inferior a 499  $\mu M$ , y aumenta para concentraciones de  $Rb^+$  superiores. La falta de efecto significativo del ATP sobre  $v_{ocl}$  observado en el experimento de la Figura IV-3 donde se empleó 250  $\mu M$   $Rb^+$  sería

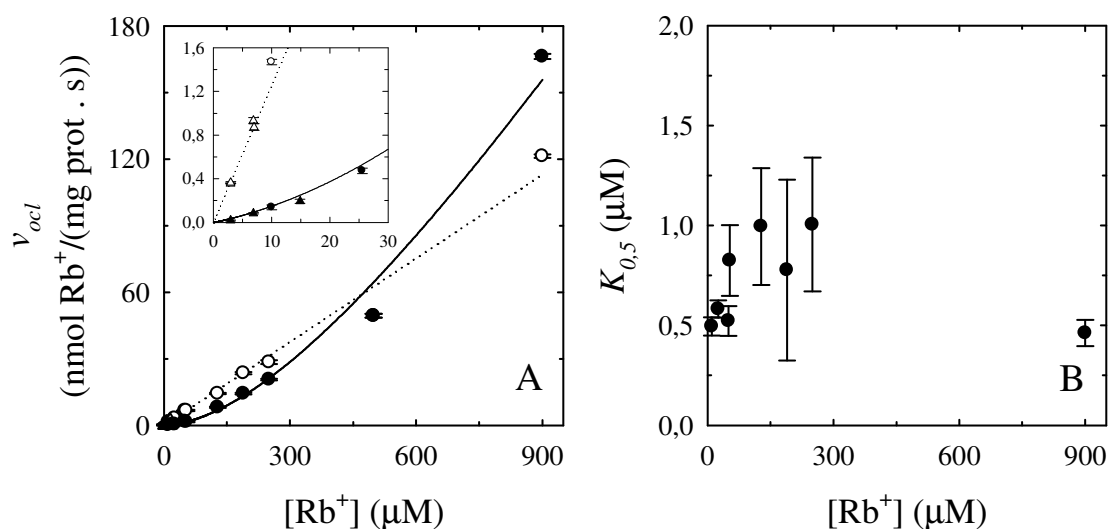
producto del error entre experimentos, ya que la Figura IV-7 muestra que al estudiar el efecto de diferentes concentraciones de ATP en un mismo experimento y en presencia de dicha concentración de  $Rb^+$  (cuadrados negros), se observan una disminución de  $v_{ocl}$ . La Figura IV-7 también revela que, independientemente de la concentración de  $Rb^+$ , se requieren concentraciones de ATP cercanas a  $1 \mu M$  para lograr la mitad del cambio máximo en  $v_{ocl}$ .

En coincidencia con los resultados ya mostrados en la Figura IV-5 (gráfico inserto en el Panel B), la variación de  $v_{ocl}$  fue adecuadamente descrita por una función hiperbólica de la concentración de ATP:

$$v_{ocl} = \frac{v_{ocl,0} K_{0,5} + v_{ocl,\infty} [ATP]}{K_{0,5} + [ATP]} \quad \text{Ecuación IV-6}$$

Los parámetros  $v_{ocl,0}$ ,  $v_{ocl,\infty}$  y  $K_{0,5}$  conservan el significado de los parámetros  $P_0$ ,  $P_\infty$  y  $K_{0,5}$  de la Ecuación IV-5. La Ecuación IV-6 fue ajustada a cada serie de resultados y se representa con líneas de trazo continuo en la Figura IV-7. Dada la escasa influencia que mostraron modificaciones en la concentración de ATP sobre  $v_{ocl}$  al emplear una concentración de  $Rb^+$  de  $499 \mu M$ , se supuso en ese caso que  $v_{ocl,0}$  era igual a  $v_{ocl,\infty}$ . El valor de los parámetros de la Ecuación IV-6 que proporcionó el mejor ajuste a los resultados se muestra con círculos en la Figura IV-8, como función de la concentración de  $Rb^+$ .

Para completar la información experimental correspondiente a concentraciones de  $Rb^+$  inferiores a  $25 \mu M$ , se realizaron experimentos empleando sólo concentraciones de ATP de 0 o  $200 \mu M$  (recordemos que esta última concentración es suficiente para considerar que se ha producido el cambio máximo en  $v_{ocl}$  sobre la base de los resultados de la Figura IV-7). El valor de  $v_{ocl}$  calculado en uno y otro caso se grafica con triángulos en el gráfico inserto de la Figura IV-8A (triángulos vacíos y llenos para 0 y  $200 \mu M$  ATP, respectivamente). Dado que en estos casos no se realizó una curva en función de la concentración de ATP, no se dispone de valores de  $K_{0,5}$ .



**Figura IV-8.** *Panel A:* Velocidad inicial de oclusión de  $\text{Rb}^+$  como función de la concentración de  $\text{Rb}^+$ . Los círculos representan los valores ajustados de los parámetros  $v_{ocl,0}$  (círculos vacíos) y  $v_{ocl,\infty}$  (círculos llenos) de la Ecuación IV-6. Los triángulos corresponden al valor de  $v_{ocl}$  obtenido en experimentos realizados en ausencia de ATP (triángulos vacíos) o en presencia de 200  $\mu\text{M}$  ATP (triángulos llenos). El gráfico inserto muestra los valores correspondientes a las menores concentraciones de  $\text{Rb}^+$ . Las líneas corresponden al mejor ajuste de las Ecuaciones IV-7 (línea punteada) y IV-8 (línea continua). *Panel B:* Valores ajustados del parámetro  $K_{0.5}$  de la Ecuación IV-6 como función de la concentración de  $\text{Rb}^+$ . En ambos paneles las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar estimado.

Los resultados mostrados en el Panel A son similares a los mostrados en el Panel F de la Figura IV-4. La velocidad inicial de oclusión en ausencia de ATP se relaciona de forma prácticamente lineal con la concentración de  $\text{Rb}^+$  (símbolos vacíos). El ajuste de la siguiente función lineal:

$$v_{ocl} = m [\text{Rb}^+] \quad \text{Ecuación IV-7}$$

proporcionó para “ $m$ ” un valor de  $0,1256 \pm 0,0041$  nmol  $\text{Rb}^+$ /(mg prot·s· $\mu\text{M}$ ). Esta función está graficada con una línea puntada en el Panel A de la figura.

Los resultados correspondientes a una concentración de ATP suficiente para producir la variación máxima en  $v_{ocl}$  (círculos y triángulos llenos) fueron bien descriptos por la función empírica que se presenta a continuación (línea continua en el gráfico):

$$v_{ocl} = \frac{a [Rb^+] + b [Rb^+]^2}{c + [Rb^+]} \quad \text{Ecuación IV-8}$$

El mejor ajuste de esta ecuación se obtuvo con los siguientes parámetros:  $a = 8,4 \pm 6,2$  nmol  $Rb^+$ /(mg prot·s),  $b = 0,310 \pm 0,074$  nmol  $Rb^+$ /(mg prot·s· $\mu$ M), y  $c = (7,6 \pm 3,3) \cdot 10^2$   $\mu$ M.

Es importante resaltar que tanto en presencia como en ausencia del nucleótido, la velocidad de oclusión exhibe una pendiente mayor a cero para concentraciones de  $Rb^+$  tendientes a cero (ver gráfico inserto), cuya magnitud corresponde al valor de  $m$  de la Ecuación IV-7 o del cociente  $a / c$  de la Ecuación IV-8, respectivamente. Este hecho sólo puede ser explicado si es posible la oclusión de un único ión  $Rb^+$  en los instantes iniciales de la reacción. Esta conclusión es razonable teniendo en cuenta que se ha demostrado la existencia, en el equilibrio, de especies con un solo  $Rb^+$  ocluido tanto en presencia como en ausencia de ATP (ver Capítulo III, Esquema III-1).

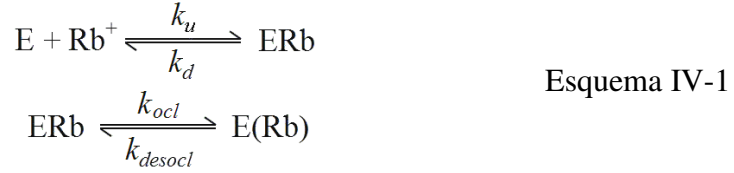
El Panel B muestra que se obtuvieron para todas las concentraciones de  $Rb^+$  ensayadas valores de  $K_{0,5}$  comprendidos entre 0,5 y 1  $\mu$ M, aunque sin una tendencia clara. Estos resultados son semejantes al valor de  $0,890 \pm 0,065$   $\mu$ M informado en el Capítulo III para la constante aparente de disociación del complejo formado por el ATP y la enzima libre de  $Rb^+$  ( $K_{ATP}$ , Tabla III-4). Esta coincidencia es esperable si tenemos en cuenta que, en las condiciones experimentales empleadas, la unión entre el ATP y la enzima había alcanzado el equilibrio antes de que ocurriera la oclusión del  $Rb^+$  (ver Materiales y Métodos: “Cálculo de la velocidad inicial de oclusión de  $Rb^+$ ”).

Por otro lado, la escasa variación de los valores de  $K_{0,5}$  para la acción del ATP frente a modificaciones de la concentración de  $Rb^+$  implica que el nucleótido a su vez debería tener una escasa influencia sobre la afinidad de la enzima por el catión.

#### *Interpretación de las variaciones en la velocidad inicial de oclusión de $Rb^+$*

Para analizar qué información brinda la forma de las curvas de  $v_{ocl}$  como función de la concentración de  $Rb^+$ , es preciso recordar que el proceso de oclusión requiere de al menos dos reacciones (ver Capítulo III): la unión del catión a la enzima, y el cambio

conformacional que conduce a la oclusión propiamente dicha. Esto se esquematiza a continuación de manera simplificada, mostrando la oclusión de un solo  $Rb^+$ :



En el Esquema IV-1, “E” representa la enzima libre y el  $Rb^+$  entre paréntesis está ocluido. Este esquema es análogo al analizado en el Capítulo III (Esquema III-2), pero se han reemplazado las constantes *de equilibrio* de disociación y de desoclusión ( $K_d$  y  $K_{desocl}$ ) por las constantes *de velocidad* de unión ( $k_u$ ), disociación ( $k_d$ ), oclusión ( $k_{ocl}$ ) y desoclusión ( $k_{desocl}$ ). Este modelo es suficiente para explicar la relación lineal entre  $v_{ocl}$  y la concentración de  $Rb^+$  observada en ausencia de ATP.

Si suponemos en el esquema simplificado IV-1:

- 1) que ERb,  $Rb^+$  y E se encuentran en equilibrio en cada instante (equilibrio rápido), siendo la constante que rige ese equilibrio igual a  $K_d = k_d / k_u$ , y
  - 2) que en el instante inicial la segunda reacción puede ser considerada irreversible ya que la concentración de E(Rb) es cero,
- entonces  $v_{ocl}$  puede ser calculada como se indica a continuación:

$$v_{ocl} = \frac{k_{ocl} [Rb^+]}{K_d + [Rb^+]} E_T \quad \text{Ecuación IV-9}$$

donde  $E_T$  representa la concentración total de enzima, que cuando el tiempo tiende a cero es igual a  $[E] + [ERb]$ . Se ve que la velocidad de aparición de E(Rb) depende de la fracción de (E + ERb) que está unida a  $Rb^+$  (cociente  $[Rb^+]/(K_d + [Rb^+])$ ), y que cuando  $[Rb^+]$  tiende a infinito,  $v_{ocl}$  tiende al límite  $k_{ocl} E_T$ . Por lo tanto, cuando la concentración de  $Rb^+$  es suficiente para saturar los sitios de unión a la  $Na^+/K^+$ -ATPasa, la velocidad inicial de oclusión debería alcanzar un límite determinado por la velocidad con que la enzima puede llevar a cabo el cambio conformacional que lleva al catión unido al estado ocluido (segunda reacción en el esquema). También puede verificarse que

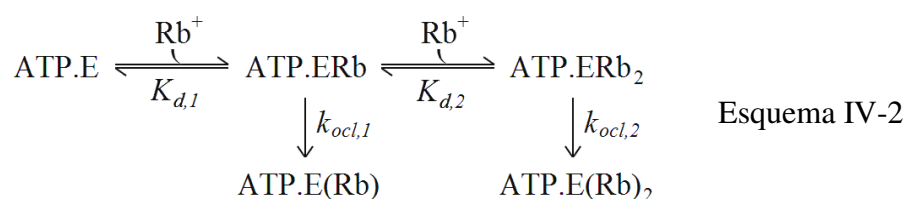
cuando en el denominador de la Ecuación IV-9 el término  $[Rb^+]$  es despreciable frente a  $K_d$ ,  $v_{ocl}$  puede ser aproximada por una ecuación lineal:

$$v_{ocl} = \frac{k_{ocl} E_T}{K_d} [Rb^+] \quad \text{Ecuación IV-10}$$

lo cual es coincidente con la relación lineal entre  $v_{ocl}$  y  $[Rb^+]$  mostrada en la Figura IV-8.

Entonces, basándonos en lo expuesto hasta aquí, podría concluirse que la relación lineal observada experimentalmente corresponde a la porción inicial de una curva más compleja que debería tender a un valor asintótico para concentraciones de  $Rb^+$  suficientemente altas. La Ecuación IV-10 permite estimar el valor de  $k_{ocl}$  a partir de la pendiente de la recta que mejor describió la variación de  $v_{ocl}$  con la concentración de  $Rb^+$  ( $0,1256 \pm 0,0041$  nmol  $Rb^+$ /(mg prot·s· $\mu$ M)). Asignando a  $K_d$  un valor de 2981  $\mu$ M (González-Lebrero *et al.*, 2002a) y a  $E_T$  un valor de 2,793 nmol  $Rb^+$ /mg prot (ver Capítulo III, Tabla III-4), se obtiene que  $k_{ocl}$  debe ser igual a 134 s<sup>-1</sup>.

Analicemos ahora los resultados obtenidos en presencia de ATP. Cuando la concentración de ATP es suficiente para considerar que todas las unidades de enzima están unidas al nucleótido, el incremento de la concentración de  $Rb^+$  se asocia con un aumento de  $v_{ocl}$  más complejo que el observado en ausencia de ATP. Para explicar este comportamiento debemos recurrir a una versión ampliada del Esquema IV-1 que contemple la unión y oclusión de dos iones  $Rb^+$ :



En el esquema se supone nuevamente que la unión del  $Rb^+$  a la enzima ocurre en equilibrio rápido y  $K_{d,1}$  y  $K_{d,2}$  representan las constantes de disociación del primer y del segundo ion  $Rb^+$ , respectivamente. Por otro lado,  $k_{ocl,1}$  y  $k_{ocl,2}$  representan las constantes de velocidad de oclusión. Al igual que antes, la oclusión se considera irreversible ya que



en los instantes iniciales las reacciones ocurren en ausencia de  $ATP.E(Rb)$  y de  $ATP.E(Rb)_2$ . De acuerdo con este esquema,  $v_{ocl}$  seguirá la siguiente función:

$$v_{ocl} = \frac{k_{ocl,1}K_{d,2}[Rb^+] + 2k_{ocl,2}[Rb^+]^2}{K_{d,1}K_{d,2} + K_{d,2}[Rb^+] + [Rb^+]^2} E_T \quad \text{Ecuación IV-11}$$

que predice que  $v_{ocl}$  aumentará desde cero hasta  $2k_{ocl,2}E_T$  cuando la concentración de  $Rb^+$  se incremente desde cero hasta infinito. La Ecuación IV-11 también permite explicar que el incremento de  $v_{ocl}$  sea bien descrito por la Ecuación IV-8: cuando  $[Rb^+]$  es despreciable frente a  $K_{d,2}$ ,  $v_{ocl}$  puede ser aproximada por la siguiente ecuación racional:

$$v_{ocl} = \frac{k_{ocl,1}[Rb^+] + 2\frac{k_{ocl,2}}{K_{d,2}}[Rb^+]^2}{K_{d,1} + [Rb^+]} E_T \quad \text{Ecuación IV-12}$$

Esta ecuación tiene la misma forma que la ecuación empírica IV-8, por lo que podríamos suponer que los valores de  $v_{ocl}$  obtenidos en presencia de 200  $\mu M$  ATP serían sólo la porción inicial de una función sigmoide de la concentración del catión. Los parámetros  $a$ ,  $b$  y  $c$  de la Ecuación IV-8 se corresponden con los coeficientes  $k_{ocl,1}E_T$ ,  $2k_{ocl,2}E_T(K_{d,2})^{-1}$  y  $K_{d,1}$  de la IV-12, respectivamente. A partir de los valores ajustados de  $a$  y  $c$  se pueden estimar  $k_{ocl,1}$  y  $K_{d,1}$  en  $3,0 \text{ s}^{-1}$  y  $760 \mu M$ .

---

# CAPÍTULO V

## *Efectos del $Rb^+$ y del ATP sobre la cinética de liberación de $Rb^+$ ocluido*

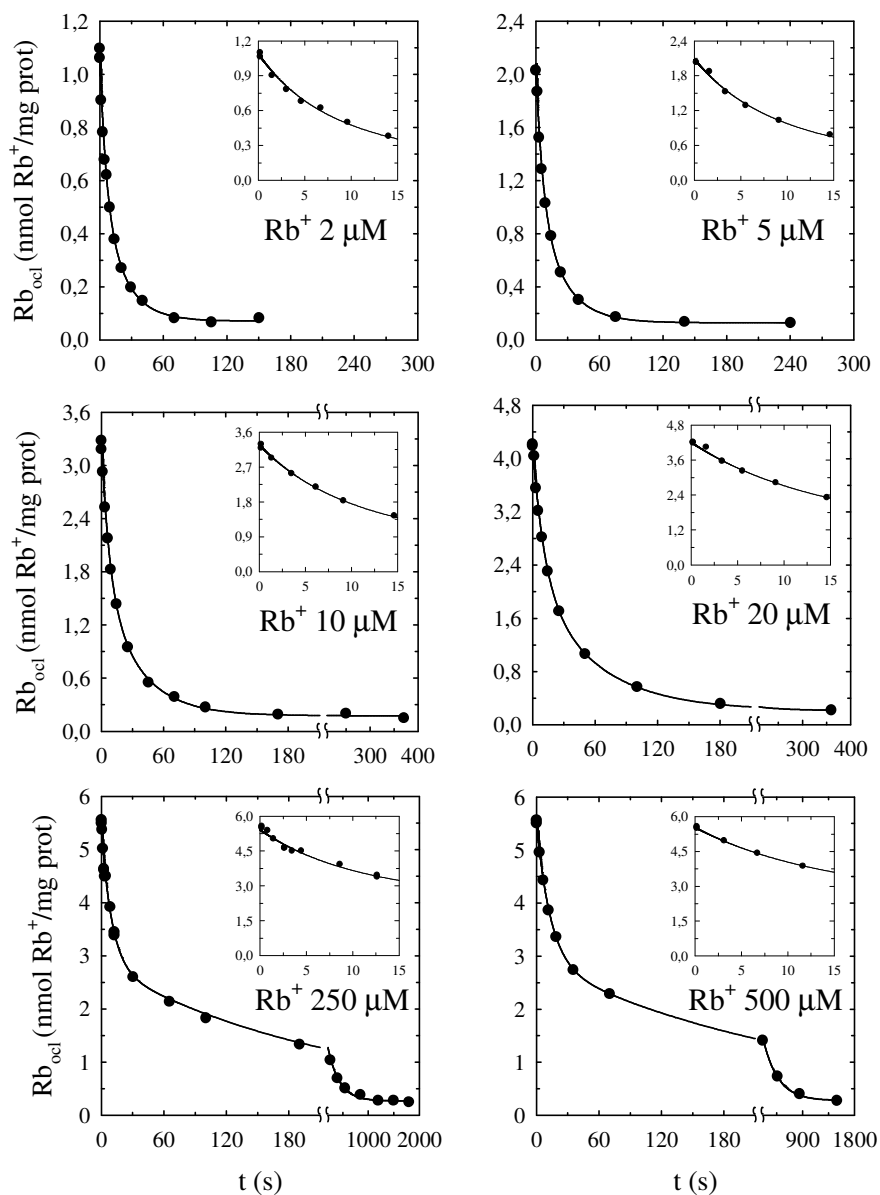
Los experimentos que se presentarán en este capítulo fueron diseñados con el fin de determinar cómo progresa en el tiempo la liberación de  $Rb^+$  desde sus sitios de oclusión en la  $Na^+/K^+$ -ATPasa. Primero se analizará la desoclusión de  $Rb^+$  en ausencia de ATP, estudiando el efecto que tienen sobre este proceso modificaciones en la concentración de  $Rb^+$ . Posteriormente se describirá qué cambios pueden observarse en la cinética de liberación, así como en el efecto ejercido sobre ella por el  $Rb^+$ , cuando el medio de incubación contiene también ATP. El estudio se completará analizando el efecto del ATP sobre la cinética de liberación del  $Rb^+$  localizado selectivamente en uno u otro de los sitios de oclusión.

### *I. Efectos del $Rb^+$ sobre la liberación de $Rb^+$ ocluido en ausencia de ATP y en condiciones de equilibrio termodinámico*

Se incubó la  $Na^+/K^+$ -ATPasa en medios de reacción que contenían  $^{86}RbCl$  durante un tiempo suficiente para que se alcanzara el equilibrio entre el  $^{86}Rb^+$  libre y el ocluido. Luego, se realizó una dilución isotópica mezclando un volumen de esa suspensión con 19 volúmenes de una solución de  $RbCl$  no radiactivo en igual concentración, a fin de promover el reemplazo del  $^{86}Rb^+$  ocluido por  $Rb^+$ . A partir de ese momento se procedió a determinar la cantidad de  $^{86}Rb^+$  que permanecía ocluido como función del tiempo. Se ha comprobado que la dilución de la enzima que ocurre durante la dilución isotópica del

$^{86}\text{Rb}^+$  no modifica sus propiedades, dado que no existe modificación de la distribución entre el  $\text{Rb}^+$  libre y el ocluido (González-Lebrero, 2001).

La Figura V-1 muestra los resultados obtenidos en experimentos como los descritos donde se emplearon concentraciones de  $\text{Rb}^+$  entre 2 y 500  $\mu\text{M}$ .



**Figura V-1.** Cinética de liberación de  $\text{Rb}^+$  ocluido en ausencia de ATP. Se grafica la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  que permanece ocluido como función del tiempo de incubación luego de reducir veinte veces su actividad específica en el medio de reacción. Los medios de desoclusión contenían la concentración de  $\text{Rb}^+$  indicada en cada panel, y las líneas continuas corresponden al mejor ajuste de la Ecuación V-1. Los gráficos insertos detallan los primeros 15 segundos de reacción.

En todos los casos la cantidad de Rb<sup>+</sup> ocluido luego de la dilución isotópica decreció en dos fases de amplitudes similares, hecho que se aprecia con mayor claridad con las concentraciones de Rb<sup>+</sup> más elevadas. Puede observarse que la velocidad de la fase más lenta disminuyó al incrementarse la concentración de Rb<sup>+</sup> en el medio de desoclusión. Para tiempos de incubación suficientemente largos se comprobó que las medidas tendían a un valor similar a la cantidad de Rb<sup>+</sup> ocluido en el equilibrio esperada para esa concentración de Rb<sup>+</sup> y la dilución isotópica efectuada.

En todas las condiciones ensayadas la función que mejor describió la variación de Rb<sub>ocl</sub> con el tiempo consistió en la suma de dos funciones exponenciales decrecientes y un término independiente:

$$Rb_{ocl} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + Rb_{ocl, \infty} \quad \text{Ecuación V-1}$$

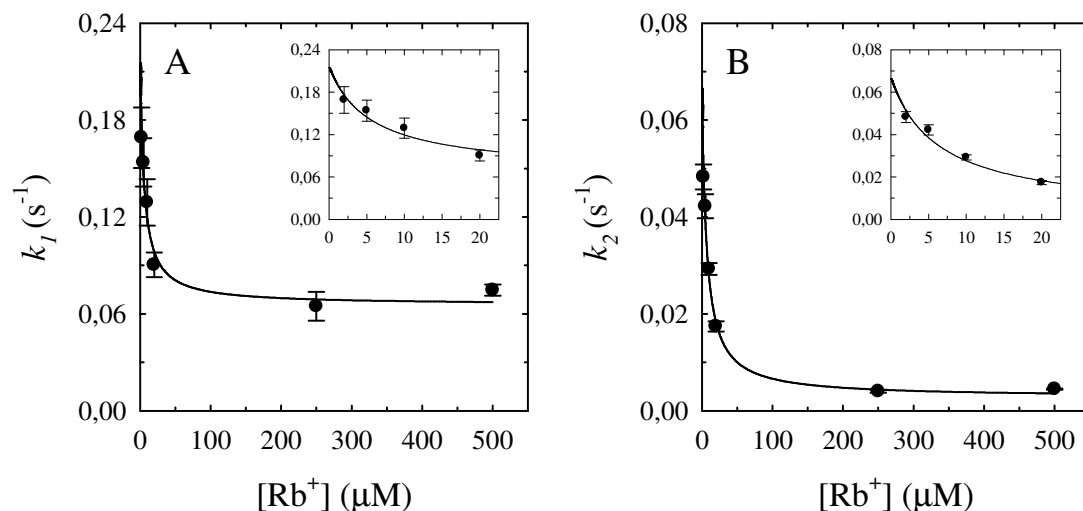
Los parámetros  $A_1$  y  $A_2$  representan la amplitud de cada una de las fases que presenta el proceso, cuyos coeficientes de velocidad son  $k_1$  y  $k_2$ , y  $Rb_{ocl, \infty}$  corresponde al valor límite de Rb<sub>ocl</sub> cuando el tiempo tiende a infinito. La bondad del ajuste de la ecuación mejoró significativamente, de acuerdo con el criterio AICc, cuando se impuso la restricción  $A_1 = A_2$ . El tiempo de incubación posterior a la dilución isotópica,  $t$ , incluye el tiempo necesario para detener la reacción de desoclusión en la cámara de frenado y lavado (3,5 milisegundos, ver Materiales y Métodos).

La Figura V-2 permite analizar cómo varían los coeficientes  $k_1$  y  $k_2$  con la concentración de Rb<sup>+</sup>. Ambos decrecen a medida que se incrementa la concentración del catión con similares afinidades aparentes, y una función hipérbolica como la que se muestra a continuación (Ecuación V-2) describió adecuadamente esta dependencia.

$$k_i = \frac{k_{i,0} K_{0,5} + k_{i,\infty} [Rb^+]}{K_{0,5} + [Rb^+]} \quad \text{Ecuación V-2}$$

La variable  $k_i$  representa a  $k_1$  o  $k_2$ , los parámetros  $k_{i,0}$  y  $k_{i,\infty}$  indican el valor que toma  $k_i$  cuando  $[Rb^+]$  es igual a cero o tiende a infinito, respectivamente, y  $K_{0,5}$  equivale a la concentración de Rb<sup>+</sup> necesaria para observar la mitad del cambio máximo en  $k_i$ . Los

valores de estos parámetros que brindaron el mejor ajuste de la Ecuación V-2 a  $k_1$  y  $k_2$  se informan en la Tabla V-1.



**Figura V-2.** Coeficientes de velocidad de las fases rápida ( $k_1$ , Panel A) y lenta ( $k_2$ , Panel B) de liberación de Rb<sup>+</sup> ocluido, como función de la concentración de Rb<sup>+</sup>. Los valores de  $k_1$  y  $k_2$  fueron obtenidos por ajuste de la Ecuación V-1 a los resultados de la Figura V-1 correspondientes a la concentración de Rb<sup>+</sup> que figura en abscisas. Las barras verticales indican  $\pm 1$  error estándar estimado. Los gráficos insertos muestran los valores de  $k_1$  y  $k_2$  para concentraciones de Rb<sup>+</sup> inferiores a 20  $\mu\text{M}$ . Las líneas continuas son el gráfico de la Ecuación V-2 con los valores de los parámetros ajustados tomados de la Tabla V-1.

**Tabla V-1.** Valores ajustados de los parámetros de la Ecuación V-2.

	$k_1$	$k_2$	
Parámetro	Valor $\pm$ E.S.	Valor $\pm$ E.S.	Unidades
$k_{i,0}$	$0,215 \pm 0,042$	$0,0665 \pm 0,0081$	$\text{s}^{-1}$
$k_{i,\infty}$	$0,0657 \pm 0,0056$	$(2,78 \pm 0,28) \cdot 10^{-3}$	$\text{s}^{-1}$
$K_{0,5}$	$5,6 \pm 3,4$	$6,4 \pm 1,6$	$\mu\text{M}$

Los valores fueron obtenidos por ajuste de la Ecuación V-2 a los valores de  $k_1$  y  $k_2$  mostrados en la Figura V-2, y se informan junto con una estimación de su error estándar.

Cuando la concentración de Rb<sup>+</sup> aumenta desde cero hasta infinito,  $k_1$  disminuye aproximadamente 3 veces, en tanto que  $k_2$  disminuye 24 veces. Es interesante notar que  $k_{2,0}$  ( $0,0665 \pm 0,0081 \text{ s}^{-1}$ ) coincide con el valor al que tiende  $k_1$  cuando la concentración

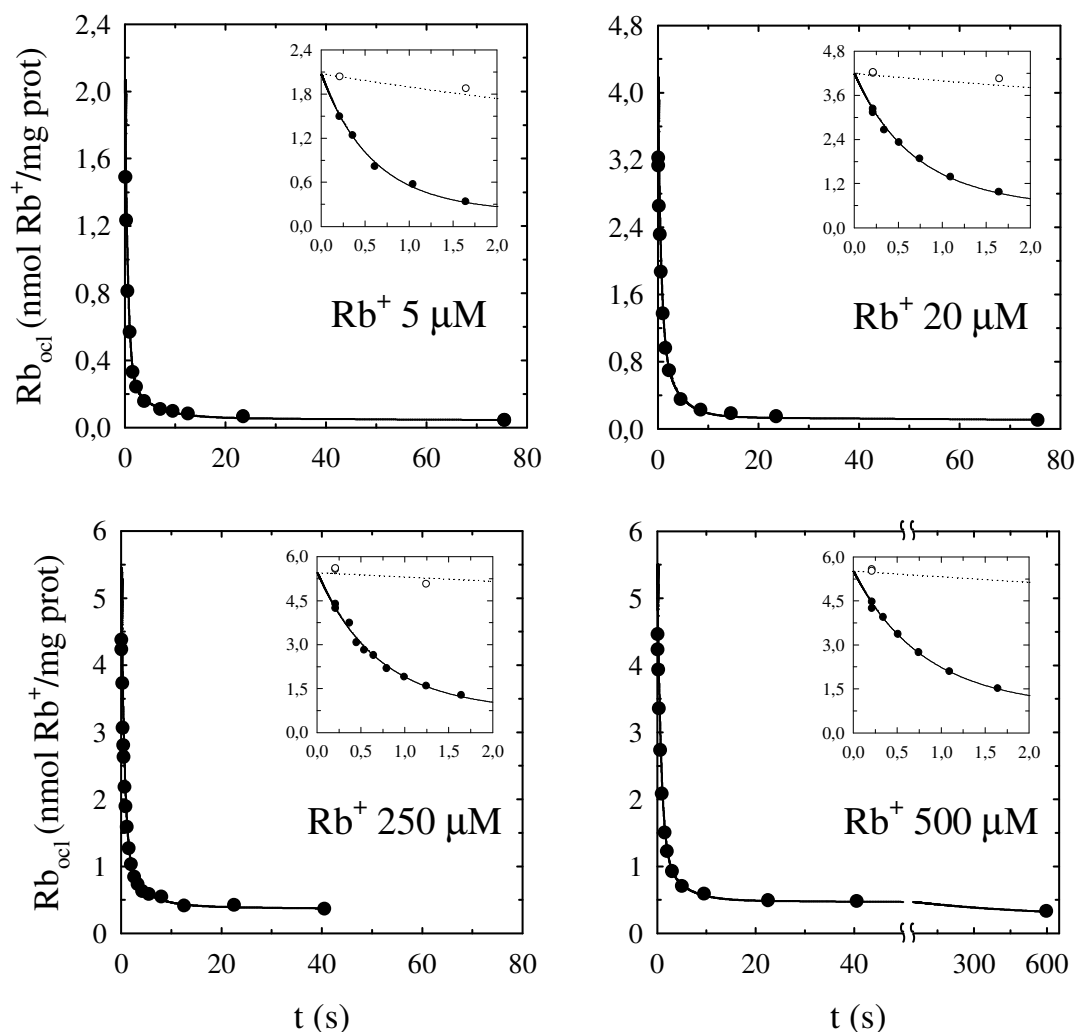
de  $Rb^+$  tiende a infinito ( $0,0657 \pm 0,0056 \text{ s}^{-1}$ ). Merece destacarse también que el valor de  $k_{2,\infty}$  que brindó el mejor ajuste es superior a cero, indicando que la fase más lenta de liberación de  $Rb^+$  ocluido debería poder ser observada sin importar lo elevada que sea la concentración de  $Rb^+$  en el medio de reacción.

El valor ajustado de  $K_{0,5}$  para la curva de  $k_1$  versus  $[Rb^+]$  no es significativamente distinto del obtenido para la variación de  $k_2$ , ni tampoco del obtenido para el incremento de las medidas de  $Rb_{ocl}$  en el equilibrio con la concentración de  $Rb^+$  en ausencia de ATP ( $5,80 \pm 0,39 \mu\text{M}$ ; ver Capítulo III). Esto sugiere que los tres efectos dependen de la interacción del  $Rb^+$  con los mismos sitios.

La disminución del valor de  $k_1$  con el incremento de la concentración de  $Rb^+$  no concuerda con resultados previos que mostraban que el coeficiente de velocidad de la fase rápida de desoclusión permanecía centrado alrededor de un valor promedio de  $0,0691 \pm 0,0041 \text{ s}^{-1}$  al variar la concentración del catión entre 2 y 500  $\mu\text{M}$  (González-Lebrero *et al.*, 2002a). No obstante, puede comprobarse que este valor no difiere significativamente del informado para  $k_{1,\infty}$  en la Tabla V-1.

## ***II. Efectos del $Rb^+$ sobre la liberación de $Rb^+$ ocluido en presencia de 2 mM ATP***

Para estudiar de qué manera los efectos del  $Rb^+$  sobre la cinética de desoclusión eran modificados por la presencia de ATP, se realizaron experimentos similares a los presentados en la sección anterior pero empleando un medio de desoclusión que contenía también ATP en una concentración de 2 mM. Los resultados se muestran en la Figura V-3.



**Figura V-3.** Cinética de liberación de  $\text{Rb}^+$  ocluido en presencia de 2 mM ATP. Se grafica la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  que permanece ocluido como función del tiempo de incubación luego de reducir veinte veces su actividad específica en el medio de reacción y de agregar ATP hasta alcanzar una concentración de 2 mM (círculos llenos). Los medios de desoclusión contenían la concentración de  $\text{Rb}^+$  indicada en cada panel. Los insertos detallan los primeros dos segundos de reacción e incluyen, a fines comparativos, medidas realizadas en el mismo experimento utilizando medios de desoclusión carentes de ATP (círculos vacíos). Las líneas son el gráfico de las Ecuaciones V-3 (trazo continuo, con ATP) o V-1 (trazo punteado, sin ATP) ajustadas a la correspondiente serie de medidas.

Para todas las concentraciones de  $\text{Rb}^+$  estudiadas, el ATP induce un incremento de la velocidad con la que disminuye la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido de entre 20 y 30 veces respecto de lo observado en ausencia del nucleótido (ver gráficos insertos).

Una adecuada descripción de los resultados requirió el ajuste de una función que consistía en la suma de tres funciones exponenciales decrecientes y un término independiente (Ecuación V-3):

$$Rb_{ocl} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + A_3 e^{-k_3 t} + Rb_{ocl, \infty} \quad \text{Ecuación V-3}$$

$A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  representan las amplitudes de las fases rápida, lenta y residual de desoclusión de  $Rb^+$ , respectivamente;  $k_1$ ,  $k_2$  y  $k_3$  sus coeficientes aparentes de velocidad y  $Rb_{ocl, \infty}$  posee el mismo significado que en la Ecuación V-1. La ecuación ajustada a los resultados experimentales se muestra con líneas de trazo continuo en la Figura V-3.

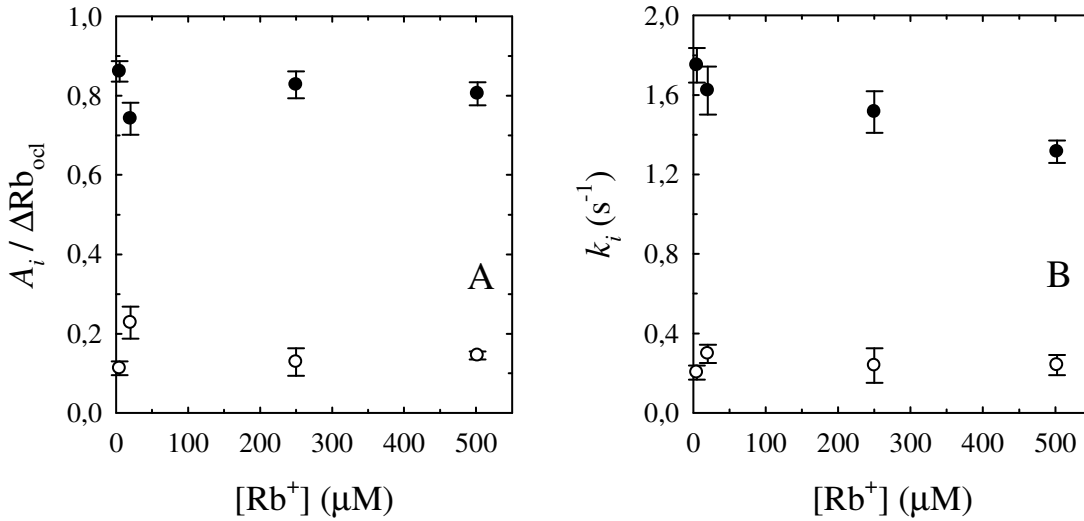
Los experimentos carecían de información suficiente para estimar con precisión los parámetros  $Rb_{ocl, \infty}$  y  $k_3$  ya que no contaban con medidas de  $Rb_{ocl}$  correspondientes a tiempos de incubación suficientemente largos, por lo que para realizar el ajuste de la Ecuación V-3 se procedió de la siguiente manera:

- 1)  $Rb_{ocl, \infty}$  se fijó en su valor esperado teniendo en cuenta las concentraciones finales de  $Rb^+$  y de ATP en el medio de reacción y la dilución isotópica del  $^{86}Rb^+$  efectuada;
- 2) se asignó a  $k_3$  un valor de  $0,00407 \text{ s}^{-1}$  para todas las concentraciones de  $Rb^+$  ensayadas: los resultados de cuatro experimentos donde se emplearon diferentes concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP y en los que fue posible ajustar  $k_3$  habían sugerido que el valor de este coeficiente no variaba marcadamente con cambios en la concentración de dichos ligandos. Los valores obtenidos fueron:  $0,0026 \pm 0,0011 \text{ s}^{-1}$ ;  $0,0037 \pm 0,0012 \text{ s}^{-1}$ ;  $0,0017 \pm 0,0023 \text{ s}^{-1}$  y  $0,00407 \pm 0,00062 \text{ s}^{-1}$ . Se asignó entonces a  $k_3$  este último valor por ser la estimación más precisa. Se verificó en los experimentos de la Figura V-3 que mantener fijo  $k_3$  en ese valor mejoraba significativamente el ajuste y reducía la incertidumbre del resto de los parámetros.

Los resultados de los ajustes mostraron que, a diferencia de lo observado en ausencia de ATP, la mayor parte del  $Rb^+$  ocluido es liberado en la fase rápida. Además, se verificó que las dos primeras fases están asociadas a más del 95% de la disminución total de  $Rb_{ocl}$ . No hemos podido identificar la naturaleza de la tercera fase de pequeña amplitud (fase residual), aunque hemos obtenido resultados que parecen descartar que se deba a la existencia de vesículas en la preparación de la  $Na^+/K^+$ -ATPasa (ver anexo a este capítulo).



La Figura V-4 permite analizar qué fracción del  $\text{Rb}^+$  es liberada durante las dos primeras fases de desoclusión ( $A_i / \Delta\text{Rb}_{\text{ocl}}$ , Panel A), así como el valor ajustado de los coeficientes de velocidad de dichas fases ( $k_i$ , Panel B).



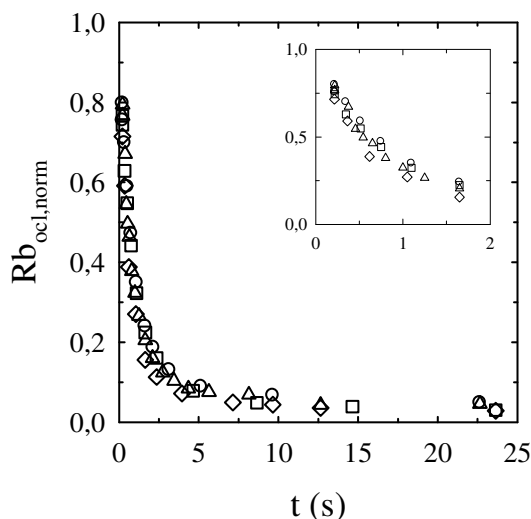
**Figura V-4.** Amplitudes (Panel A) y coeficientes de velocidad (Panel B) de las fases rápida (●) y lenta (○) de liberación de  $\text{Rb}^+$  ocluido en medios de reacción que contenían 2 mM ATP, como función de la concentración de  $\text{Rb}^+$ . Los resultados se obtuvieron por ajuste de la Ecuación V-3 a las medidas mostradas en la Figura V-3. Las amplitudes se expresan como fracción del cambio total observado ( $\Delta\text{Rb}_{\text{ocl}}$ ), calculado como  $A_1 + A_2 + A_3$ . Las barras verticales indican  $\pm 1$  error estándar estimado.

No se observa, entre las condiciones estudiadas, una diferencia significativa en la fracción que representa la amplitud de la fase rápida o de la lenta respecto del cambio total (Panel A). En promedio, un 80% de la liberación de  $\text{Rb}^+$  ocurre durante la primera y un 15% durante la segunda.

El valor del coeficiente de velocidad de la fase rápida,  $k_1$ , disminuye levemente al incrementarse la concentración de  $\text{Rb}^+$ , mientras que no se aprecia una modificación significativa en el valor de  $k_2$  (Panel B). El valor de  $k_1$  es marcadamente superior al de los coeficientes obtenidos en ausencia de ATP, en forma consistente con el ya señalado incremento de la velocidad de desoclusión inducido por el nucleótido.

La similitud de los parámetros que caracterizan la cinética de desoclusión de  $\text{Rb}^+$  en las diferentes condiciones hace que todas las curvas de la Figura V-3 sean superponibles si

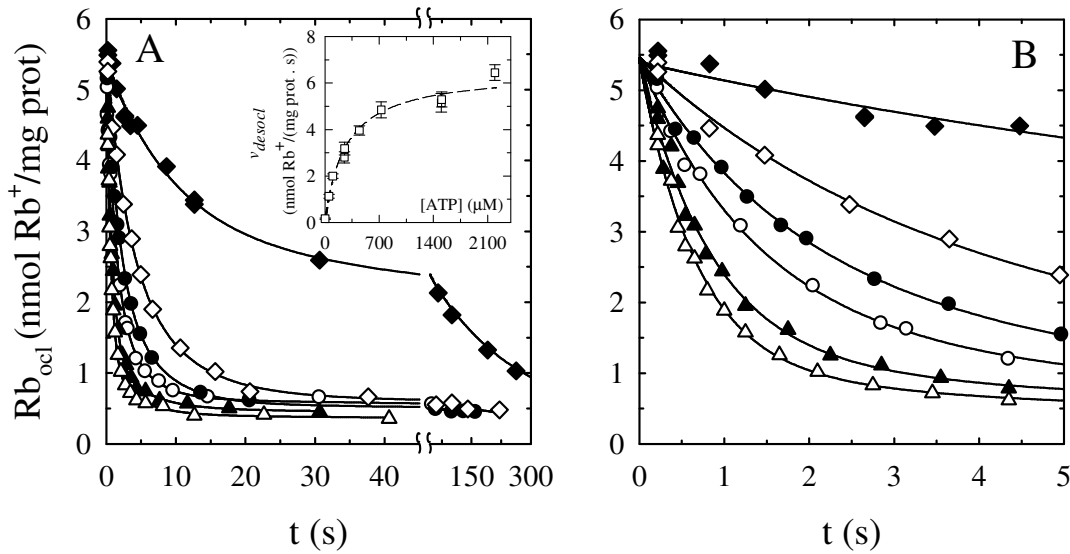
se las normaliza expresando cada medida como una fracción del cambio máximo. Esto se muestra en la Figura V-5.



**Figura V-5.** Comparación de las medidas de  $Rb_{ocl}$  mostradas en la Figura V-3, normalizadas empleando la ecuación  $Rb_{ocl,norm} = (Rb_{ocl} - Rb_{ocl,\infty}) / (A_1 + A_2 + A_3)$ , donde  $Rb_{ocl,\infty}$ ,  $A_1$ ,  $A_2$  y  $A_3$  son los parámetros de la Ecuación V-3 ajustada a las medidas del correspondiente experimento. Los símbolos corresponden a las siguientes concentraciones de  $Rb^+$ : 5 ( $\nabla$ ), 20 ( $\square$ ), 250 ( $\triangle$ ) y 500 ( $\circ$ )  $\mu M$ . El gráfico inserto detalla los primeros dos segundos de reacción.

### III. Efectos del ATP sobre la liberación de $Rb^+$ ocluido

El análisis de los resultados experimentales presentados en la Figura V-3 mostró que, en presencia de 2 mM ATP, la desoclusión de  $Rb^+$  ocurre mayoritariamente en una fase, cuya velocidad es marcadamente mayor que la observada en ausencia del nucleótido. Con el fin de entender más acabadamente la manera en que el ATP induce esta modificación, se llevaron a cabo experimentos siguiendo el procedimiento general descrito en la sección anterior, empleando una concentración de  $Rb^+$  de 250  $\mu M$  y diferentes concentraciones de ATP en el medio de desoclusión. Las medidas de la cantidad de  $^{86}Rb^+$  ocluido como función del tiempo posterior a la dilución isotópica se presentan en la Figura V-6. Para mayor claridad, los experimentos incluidos en la figura corresponden sólo a algunas de las concentraciones de ATP ensayadas.

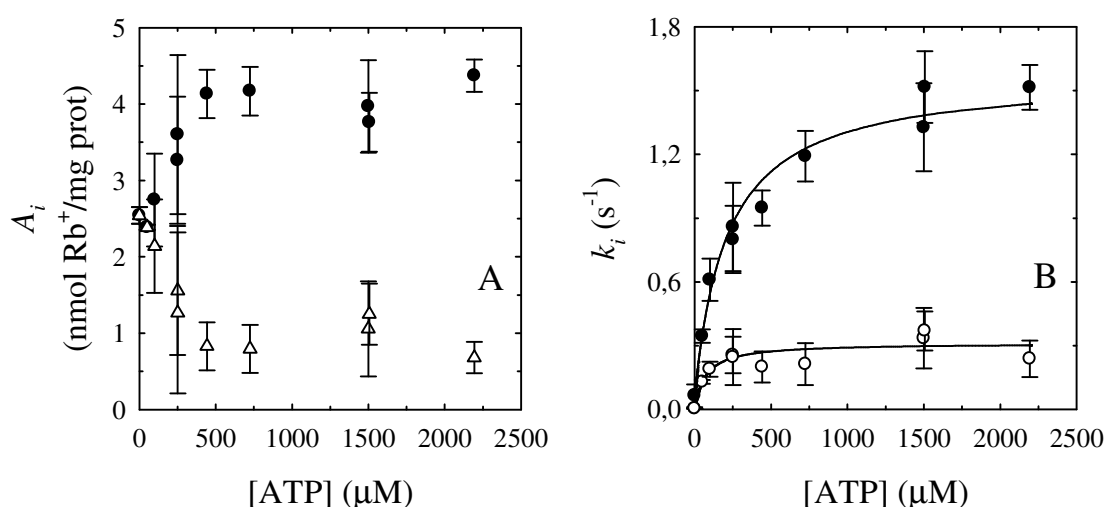


**Figura V-6.** Cinética de liberación de  $\text{Rb}^+$  ocluido en presencia de ATP. La primera incubación se realizó en ausencia de ATP y la concentración de  $^{86}\text{RbCl}$  fue de 250  $\mu\text{M}$ . Luego de la dilución isotópica, el medio de reacción contenía la misma concentración de  $\text{Rb}^+$  total y la siguiente concentración de ATP: 0 (◆), 50 (◇), 100 (●), 250 (○), 725 (▲) o 2200 (△)  $\mu\text{M}$ . Los valores del eje de abscisas corresponden al tiempo transcurrido luego de realizada la dilución isotópica. El Panel B detalla los primeros cinco segundos de reacción. Las líneas continuas son el gráfico de la Ecuación V-1 (ausencia de ATP) o V-3 ajustada a la correspondiente serie de medidas. El gráfico inserto en el Panel A muestra la velocidad inicial de desoclusión de  $\text{Rb}^+$  ( $v_{\text{desocl}}$ ) como función de la concentración de ATP, calculada como se explica en el texto. Las barras verticales indican  $\pm 1$  error estándar. La línea punteada corresponde a la ecuación  $(v_0 K_{0,5} + v_{\infty} [\text{ATP}]) / (K_{0,5} + [\text{ATP}])$  luego de asignar a sus parámetros el valor que proporcionó el mejor ajuste a los resultados (ver texto).

Los resultados obtenidos en medios de incubación que contenían ATP fueron bien descriptos por la Ecuación V-3. Puede verse cómo el incremento en la concentración de ATP causa un aumento progresivo de la velocidad de desoclusión. En el gráfico inserto en el Panel A puede analizarse cuantitativamente este efecto: allí se grafica cómo varía la velocidad de desoclusión evaluada a tiempo cero ( $v_{\text{desocl}}$ ) con variaciones en la concentración de ATP. La velocidad fue calculada derivando la Ecuación V-3 respecto del tiempo y obteniendo el valor absoluto de la función derivada para  $t = 0$ . Esto condujo a la ecuación:  $v_{\text{desocl}} = A_1 \cdot k_1 + A_2 \cdot k_2 + A_3 \cdot k_3$ . Como se indica en la leyenda de la figura, el incremento de  $v_{\text{desocl}}$  es adecuadamente descripto por una función hiperbólica. Ésta crece desde  $0,166 \pm 0,012$  hasta  $6,51 \pm 0,32$  nmol  $\text{Rb}^+$ /(mg prot·s) cuando se incrementa la concentración de ATP desde cero hasta infinito, y alcanza un valor semi-

máximo cuando la concentración de ATP es  $278 \pm 31 \mu M$ . Este último valor es consistente con la interacción del ATP con formas de la enzima con  $Rb^+$  ocluido (aquéllas formadas durante la primera incubación) y es comparable al valor de  $K_{0,5}$  para la disminución de  $Rb_{ocl}$  en el equilibrio inducida por el ATP, en medios de reacción que contienen  $Rb^+$   $250 \mu M$  ( $420 \pm 58 \mu M$ , ver Figura III-3).

El cambio de la amplitud y de los coeficientes de velocidad de las dos primeras fases de desoclusión originado por cambios en la concentración de ATP puede ser analizado en la Figura V-7.



**Figura V-7.** Amplitudes (Panel A) y coeficientes de velocidad (Panel B) de las fases rápida (●) y lenta (○) de liberación de  $Rb^+$  ocluido como función de la concentración de ATP. Los resultados se obtuvieron por ajuste de la Ecuación V-1 (ausencia de ATP) o V-3 a las medidas correspondientes de la Figura V-3 y a otras no incluidas en dicha figura. Las barras verticales indican  $\pm 1$  error estándar estimado. Las líneas continuas en el Panel B son el gráfico de la Ecuación V-4, cuyos parámetros fueron reemplazados por los valores mostrados en la Tabla V-2.

Como se había mencionado en la sección I, en ausencia de ATP no existe diferencia significativa entre la amplitud de la primera y de la segunda fase de desoclusión. A medida que aumenta la concentración de ATP se observa un predominio de la primera fase sobre la segunda, alcanzando una y otra valores promedio que corresponden a un 78% y un 18% respectivamente del cambio total observado. La fracción del cambio total representado por la fase residual varió entre el 8 y el 4%.

Los valores de  $k_1$  y  $k_2$  aumentaron marcadamente al incrementarse la concentración de ATP (Panel B). El aumento de  $A_1$  y de  $k_1$  es la principal causa del incremento de  $v_{desocl}$  señalada al analizar la Figura V-6. El mejor ajuste a los valores de ambos coeficientes se obtuvo con la siguiente función hiperbólica:

$$k_i = \frac{k_{i,0}K_{0,5} + k_{i,\infty}[ATP]}{K_{0,5} + [ATP]} \quad \text{Ecuación V-4}$$

donde  $k_{i,0}$  y  $k_{i,\infty}$  corresponden a los valores límite que toma el coeficiente  $k_i$  cuando la concentración de ATP es cero o tiende a infinito, respectivamente, y  $K_{0,5}$  indica la concentración de ATP para la cual se observa la mitad del cambio máximo en  $k_i$ . Los valores de estos parámetros que permitieron obtener el mejor ajuste a  $k_1$  y  $k_2$  se muestran en la Tabla V-2. El valor de  $K_{0,5}$  para el efecto del ATP sobre  $k_1$  es similar al hallado para el efecto sobre  $v_{desocl}$ . En cambio, los ajustes sugieren que el efecto sobre  $k_2$  se ejerce con una afinidad aparente mayor.

**Tabla V-2.** Valores ajustados de los parámetros de la Ecuación V-4 a los resultados de la Figura V-7 (Panel B).

	$k_1$		$k_2$	
Parámetro	Valor $\pm$ E.S.	Valor $\pm$ E.S.		Unidades
$k_{i,0}$	$0,0649 \pm 0,0055$	$(4,25 \pm 0,54) \cdot 10^{-3}$		$s^{-1}$
$k_{i,\infty}$	$1,571 \pm 0,085$	$0,311 \pm 0,024$		$s^{-1}$
$K_{0,5}$	$214 \pm 30$	$72 \pm 21$		$\mu M$

Los valores fueron obtenidos por ajuste de la Ecuación V-4 a los valores de  $k_1$  y  $k_2$  mostrados en la Figura V-7 y se informan junto con una estimación de su error estándar.

#### ***IV. Liberación de Rb<sup>+</sup> localizado selectivamente en uno de los sitios de oclusión***

La liberación de Rb<sup>+</sup> ocluido en condiciones en que dicho catión es el único ligando de la enzima tiene lugar en dos fases de amplitudes iguales (Figura V-1), evidenciándose además una disminución de la velocidad de la fase lenta frente a incrementos en la

concentración de  $Rb^+$  (Figura V-2). Ambas observaciones concuerdan con las predicciones de modelos que suponen que la desoclusión es un proceso *secuencial* y *ordenado*. Uno de los modelos que explica estas observaciones fue formulado en nuestro laboratorio (González-Lebrero *et al.*, 2002a) y fue discutido en la Introducción. Éste propone que cada fase se identifica con la liberación de  $Rb^+$  desde uno de los dos sitios de unión/oclusión. Como se hizo en la Introducción, llamaremos “sitio *f*” a aquél asociado a la primera fase de desoclusión, y “sitio *s*” al asociado a la segunda, más lenta.

En presencia de ATP, en cambio, la secuencialidad en la desoclusión del  $Rb^+$  parece no estar conservada. Esta conclusión se basa en que:

- 1) la amplitud de la fase rápida sugiere que está asociada a la liberación de más de un mol de  $Rb^+$  por mol de enzima (Figura V-7, Panel A), y
- 2) no es evidente un efecto del  $Rb^+$  sobre la velocidad de la fase lenta (Figura V-4, Panel B).

Con el fin de dar mayor sustento a esa conclusión se determinó, en presencia de ATP, el curso en el tiempo de la liberación de  $^{86}Rb^+$  localizado selectivamente en uno u otro de los sitios de oclusión. La lógica en que se basan estos experimentos es que, si el nucleótido indujera una pérdida completa de secuencialidad en la liberación del  $Rb^+$  ocluido, el comportamiento observado debería ser el mismo independientemente del sitio desde el cual se libera el catión.

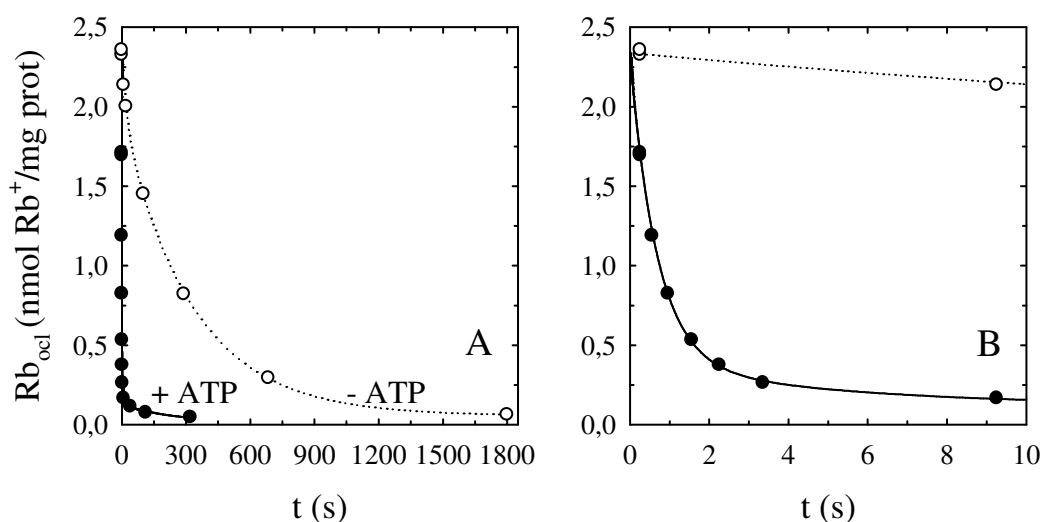
El procedimiento experimental empleado para localizar  $^{86}Rb^+$  selectivamente en cada sitio de oclusión fue explicado en detalle en Materiales y Métodos (“*Medidas del curso en el tiempo de la liberación de  $Rb^+$  ocluido selectivamente en uno de los sitios de oclusión*”).

#### *Liberación de $Rb^+$ localizado en el sitio “s”*

Para ocupar selectivamente el sitio *s* con  $^{86}Rb^+$  se realizó una primera incubación de la enzima con  $^{86}RbCl$  en una concentración de 100  $\mu M$ , durante el tiempo necesario para que el sistema alcanzara el equilibrio. Un volumen de la suspensión resultante se mezcló con tres volúmenes de una solución de  $RbCl$  en concentración suficiente para que la suma de las concentraciones finales de  $^{86}Rb^+$  y  $Rb^+$  fuera 500  $\mu M$  (verificándose

una dilución isotópica del  $^{86}\text{Rb}^+$  de 20 veces) y se dejó progresar la reacción por 48 segundos. Durante ese tiempo tiene lugar principalmente la liberación del  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido en el sitio *f* (ver Figura V-1, panel correspondiente a  $\text{Rb}^+$  500  $\mu\text{M}$ ). Finalizada esta segunda incubación, la suspensión se diluyó diez veces con una solución que contenía cantidades de  $\text{RbCl}$  y de ATP suficientes para obtener concentraciones finales de 1 y 2 mM respectivamente. Se midió la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido remanente luego de transcurridos distintos tiempos desde esta última dilución, obteniéndose los resultados de la Figura V-8 (símbolos llenos). En la Figura V-8 también se grafican las medidas obtenidas al realizar el experimento descrito pero sin el agregado de ATP en la última incubación (símbolos vacíos). Las determinaciones realizadas en ausencia de ATP permiten tener un control del proceso de marcado selectivo y también mejorar la estimación de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido a tiempo cero.

El mejor ajuste a los resultados obtenidos en ausencia de ATP lo proporcionó una suma de dos funciones exponenciales decrecientes y un término constante (Ecuación V-1), en tanto que en el caso de los resultados obtenidos en presencia de ATP, el mejor ajuste se obtuvo con la suma de tres funciones exponenciales decrecientes y un término constante (Ecuación V-3). Los valores de los parámetros que resultaron del ajuste de ambas ecuaciones se muestran en la Tabla V-3.



**Figura V-8.** Cinética de liberación de  $^{86}\text{Rb}^+$  localizado selectivamente en el sitio *s*. La desoclusión se llevó a cabo en un medio de reacción que contenía  $\text{Rb}^+$  1 mM y ATP 0 (○) o 2 mM (●). El Panel B muestra los primeros 10 segundos de reacción. Las líneas son el gráfico de la Ecuación V-1 (línea punteada) o V-3 (línea continua), cuyos parámetros fueron reemplazados por los valores mostrados en la Tabla V-3.

**Tabla V-3.** Resultados del ajuste de los parámetros de las Ecuaciones V-1 y V-3 a los resultados de la Figura V-8.

Parámetro	- ATP	+ 2 mM ATP	Unidades
	Valor $\pm$ E.S.	Valor $\pm$ E.S.	
$A_1$	$0,400 \pm 0,055$ (17,5%)	$1,935 \pm 0,046$ (83,2%)	nmol $Rb^+$ / mg prot
$k_1$	$0,043 \pm 0,012$	$1,471 \pm 0,059$	$s^{-1}$
$A_2$	$1,883 \pm 0,051$ (82,5%)	$0,277 \pm 0,045$ (11,9%)	nmol $Rb^+$ / mg prot
$k_2$	$(3,05 \pm 0,11) \cdot 10^{-3}$	$0,208 \pm 0,044$	$s^{-1}$
$A_3$		$0,113 \pm 0,068$ (4,9%)	nmol $Rb^+$ / mg prot
$k_3$		$(4,07 \pm 0,62) \cdot 10^{-3}$	$s^{-1}$
$Rb_{ocl,\infty}$	$0,055 \pm 0,077$	$0,0126$ (*)	nmol $Rb^+$ / mg prot

Los valores fueron obtenidos ajustando las Ecuaciones V-1 (- ATP) y V-3 (+ 2 mM ATP) a los resultados mostrados en la Figura V-8, y se informan junto con una estimación de su error estándar. Entre paréntesis se indica el porcentaje del cambio máximo en  $Rb_{ocl}$  representado por cada fase. (\*) Este valor se mantuvo fijo en el ajuste, y se le asignó el valor de  $Rb_{ocl}$  calculado teniendo en cuenta el Esquema III-1, las concentraciones finales de  $Rb^+$  y de ATP y la dilución isotópica del  $^{86}Rb^+$ .

En ausencia de ATP, la desoclusión de  $Rb^+$  ocurre predominantemente en una fase cuyo coeficiente de velocidad concuerda con el que se esperaría para la fase lenta de desoclusión en presencia de  $Rb^+$  1 mM (Figura V-2 y Ecuación V-2). Como se explicó en Materiales y Métodos, con el procedimiento empleado no es posible evitar que una pequeña fracción del  $^{86}Rb^+$  ocluido se localice en el sitio  $f$ , lo cual explica la observación del componente rápido de pequeña amplitud. Es importante notar que el porcentaje del cambio total representado por cada fase se asemeja al valor predicho por el modelo propuesto por González-Lebrero *et al.* (2002a) para explicar la oclusión de  $Rb^+$  a través de la ruta directa en ausencia de otros ligandos (12% y 88% para las fases rápida y lenta, respectivamente; ver Materiales y Métodos).

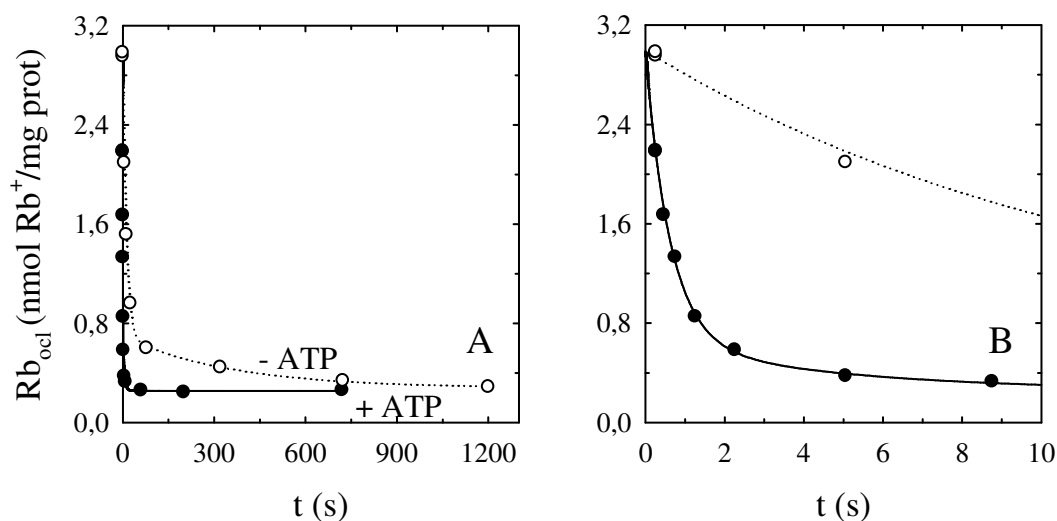
En contraste con los resultados recién comentados, cuando el medio de reacción contiene ATP la liberación del  $^{86}Rb^+$  ocluido es mayoritariamente rápida, y las fases tempranas abarcan más del 95% del proceso. Los coeficientes de velocidad de la primera y segunda fases son marcadamente superiores a los observados en ausencia de ATP y, al igual que la fracción del cambio total que cada fase representa, son similares



a los informados al analizar las cinéticas de desoclusión en presencia de 2 mM ATP y ocupando ambos sitios con  $^{86}Rb^+$  (Figura V-4).

### *Liberación de $Rb^+$ localizado en el sitio "f"*

La obtención de especies con  $^{86}Rb^+$  ocluido selectivamente en el sitio *f* se llevó a cabo mediante el procedimiento descrito anteriormente para marcar el catión ubicado en el sitio *s*, pero empleando RbCl en la primera incubación y  $^{86}RbCl$  en la segunda. La Figura V-9 muestra los resultados obtenidos cuando se estudió la liberación de  $^{86}Rb^+$  desde las especies así formadas, en un medio de reacción que contenía RbCl 1 mM en presencia (símbolos llenos) o ausencia (símbolos vacíos) de ATP 2 mM. La cinética de desoclusión observada en ambas condiciones pudo ser bien descrita por la Ecuación V-1. El valor de los parámetros que permitió obtener el mejor ajuste a los resultados experimentales se informa en la Tabla V-4.



**Figura V-9.** Cinética de liberación de  $^{86}Rb^+$  localizado selectivamente en el sitio *f*. La desoclusión se llevó a cabo en un medio de reacción que contenía  $Rb^+$  1 mM y ATP 0 (○) o 2 mM (●). El Panel B muestra un detalle de los primeros 10 segundos de reacción. Las líneas son el gráfico de la Ecuación V-1, cuyos parámetros fueron reemplazados por los valores mostrados en la Tabla V-4.

**Tabla V-4.** Resultados del ajuste de los parámetros de la Ecuación V-1 a los resultados de la Figura V-9.

Parámetro	- ATP	+ 2 mM ATP	Unidades
	Valor $\pm$ E.S.	Valor $\pm$ E.S.	
$A_1$	$2,300 \pm 0,052$ (84,6%)	$2,332 \pm 0,091$ (85,2%)	nmol $Rb^+$ / mg prot
$k_1$	$0,0853 \pm 0,0045$	$1,61 \pm 0,10$	$s^{-1}$
$A_2$	$0,418 \pm 0,038$ (15,4%)	$0,406 \pm 0,092$ (14,8%)	nmol $Rb^+$ / mg prot
$k_2$	$(2,81 \pm 0,73) \cdot 10^{-3}$	$0,216 \pm 0,052$	$s^{-1}$
$Rb_{ocl,\infty}$	$0,277 \pm 0,074$	$0,26 \pm 0,13$	nmol $Rb^+$ / mg prot

Los valores fueron obtenidos ajustando la Ecuación V-1 a los resultados mostrados en la Figura V-9, y se informan junto con una estimación de su error estándar. Entre paréntesis se indica el porcentaje del cambio máximo en  $Rb_{ocl}$  representado por cada fase.

La desoclusión en ausencia de ATP tuvo lugar en dos fases, correspondiendo a la más rápida la mayor fracción del cambio total en  $Rb_{ocl}$ . El hecho de que un 15,4% del  $^{86}Rb^+$  ocluido haya sido liberado lentamente está de acuerdo con un valor de 17,3% calculado a partir de simulaciones (ver Materiales y Métodos). El valor ajustado de los coeficientes de velocidad  $k_1$  y  $k_2$  resultó muy similar al esperado considerando los resultados de la Figura V-2 y la Ecuación V-2.

En presencia de 2 mM ATP, se observó nuevamente que la mayor parte del  $^{86}Rb^+$  ocluido es liberado de manera rápida. Resulta interesante notar que los coeficientes de velocidad y la fracción del cambio total que correspondió a cada fase coincidieron con los valores obtenidos al estudiar la desoclusión de  $^{86}Rb^+$  desde el sitio *s* (Tabla V-3).

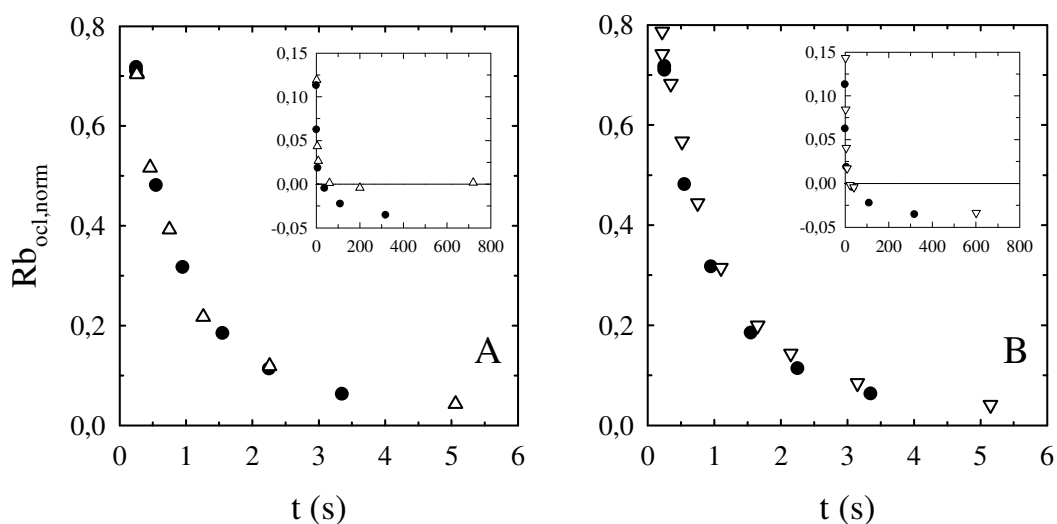
Merece destacarse que, a diferencia de lo observado en experimentos mostrados anteriormente en este capítulo donde se estudió la cinética de desoclusión de  $Rb^+$  en presencia de ATP, no fue evidente la existencia de una tercera fase de desoclusión (fase residual), y las medidas correspondientes a tiempos de incubación suficientemente largos se distribuyeron alrededor del valor esperado según la composición final del medio de reacción y la dilución isotópica efectuada.

Los resultados presentados en las Figuras V-8 y V-9, y los valores de las Tablas V-3 y V-4, muestran que, mientras que en ausencia de ATP existe una clara diferencia entre la

cinética de desoclusión del Rb<sup>+</sup> localizado selectivamente en el sitio *s* o en el sitio *f*, esto no es así en presencia del nucleótido. En este último caso, la cinética de liberación desde uno y otro de los sitios de oclusión es prácticamente idéntica, más allá de la observación de una tercera fase de pequeña amplitud sólo cuando el <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> es liberado desde el sitio *s*. Para corroborar esta conclusión de manera gráfica, los resultados correspondientes a la desoclusión de <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> desde uno y otro sitio en presencia de ATP fueron normalizados y comparados. La normalización se efectuó empleando la siguiente ecuación:

$$Rb_{ocl,norm} = \frac{Rb_{ocl} - A_3 - Rb_{ocl,\infty}}{A_1 + A_2} \quad \text{Ecuación V-5}$$

Al aplicar esta transformación las medidas de Rb<sub>ocl</sub> quedan expresadas como una fracción del cambio ( $A_1 + A_2$ ), y al tender el tiempo a infinito, tienden a un valor igual a  $-A_3 / (A_1 + A_2)$ . El resultado de esta comparación se muestra en el Panel A de la Figura V-10. Puede apreciarse que las primeras dos fases son perfectamente superponibles. Por otro lado, en el Panel B de la misma figura se muestra la superposición entre la curva de desoclusión de <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> desde el sitio *s* y aquella obtenida para la desoclusión de <sup>86</sup>Rb<sup>+</sup> desde *ambos* sitios (resultados mostrados con símbolos llenos en la Figura V-3, Panel correspondiente a 500 μM Rb<sup>+</sup>, y normalizados empleando la Ecuación V-5).



**Figura V-10.** Cinética de desoclusión de  $^{86}Rb^+$  en presencia de ATP 2 mM. El  $^{86}Rb^+$  se encontraba localizado en ambos sitios de oclusión ( $\nabla$ ), o mayoritariamente en el sitio  $s$  ( $\bullet$ ) o el sitio  $f$  ( $\triangle$ ). Los resultados fueron tomados de las Figuras V-3 (Panel  $Rb^+$  500  $\mu$ M), V-8 y V-9, respectivamente, y normalizados como indica la Ecuación V-5. Se muestran en los paneles principales las medidas normalizadas correspondientes a tiempos de incubación menores a 6 segundos, y en los gráficos insertos sólo aquéllas cuya magnitud resultó menor a 0,15.



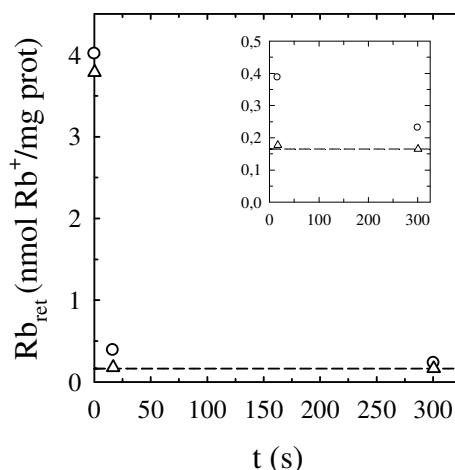
---

## ANEXO AL CAPÍTULO V

Hemos mencionado que cuando se estudia la cinética de desoclusión de  $^{86}\text{Rb}^+$  localizado en ambos sitios de oclusión o selectivamente en el sitio *s*, en presencia de ATP, se obtienen curvas que muestran al menos tres fases. La fase más lenta (que llamamos fase residual) posee una amplitud muy pequeña y está caracterizada por un coeficiente de velocidad aproximadamente igual a  $0,004\text{ s}^{-1}$ , que no varía significativamente al cambiar las concentraciones de  $\text{Rb}^+$  o de ATP. En cambio, no se observa esta fase al estudiar la desoclusión de  $^{86}\text{Rb}^+$  desde el sitio *f*. Si bien esto podría reflejar que la liberación desde el sitio *s* inducida por ATP responde a un mecanismo más complejo que la liberación desde el sitio *f*, también podría suponerse que la fase residual corresponde a la lenta liberación de  $^{86}\text{Rb}^+$  desde el interior de vesículas remanentes en la preparación de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa empleada. Como se explicó en Materiales y Métodos, el procedimiento utilizado para estudiar la desoclusión de  $^{86}\text{Rb}^+$  consiste en una primera incubación de la enzima con el catión ( $^{86}\text{Rb}^+$  o  $\text{Rb}^+$  no marcado, dependiendo del experimento), que se extiende por un tiempo suficiente para que el sistema alcance el equilibrio (entre 15 y 30 minutos), y posteriormente se realiza una dilución isotópica para promover el intercambio del  $\text{Rb}^+$  ocluido por  $\text{Rb}^+$  del medio de reacción. De existir vesículas en la preparación de enzima, podría producirse la acumulación de  $^{86}\text{Rb}^+$  en su interior durante la primera incubación en los experimentos en que se desea localizar  $^{86}\text{Rb}^+$  en ambos sitios de oclusión o selectivamente en el sitio *s*. Sin embargo, esto no ocurriría cuando se desea ocupar con  $^{86}\text{Rb}^+$  el sitio *f* ya que en dicha incubación se emplea  $\text{Rb}^+$  no radiactivo. El hecho de que la fase residual tampoco sea evidente cuando se estudia la desoclusión de  $^{86}\text{Rb}^+$  en ausencia de ATP, aun cuando el procedimiento experimental también requiere que la primera incubación de la enzima sea con  $^{86}\text{Rb}^+$ , podría deberse a que la fase residual no puede ser distinguida de la fase lenta de desoclusión, de similar coeficiente de velocidad y amplitud mucho mayor.

Si la fase residual de liberación de  $^{86}\text{Rb}^+$  reflejara el lento flujo de salida de este catión del interior de vesículas, la adición de un agente permeabilizante debería acelerar esa salida y facilitar el lavado del  $^{86}\text{Rb}^+$  en la cámara de frenado y lavado empleada en nuestras determinaciones de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  (ver Materiales y Métodos). Eso permitiría que sólo se detecte el  $^{86}\text{Rb}^+$  *ocluido* en la enzima, desapareciendo la fase residual. Para comprobar esta hipótesis se empleó alameticina como agente permeabilizante, un péptido con la capacidad de incorporarse a membranas lipídicas y agregarse para formar grandes poros que permiten el pasaje de moléculas tan grandes como el ATP. Cabe aclarar que la alameticina ha sido empleada con éxito como agente permeabilizante de células enteras y de vesículas y proteoliposomas derivados de retículo sarcoplásmico (Ritov *et al.*, 1993), y de vesículas derivadas de mucosa gástrica (Montes *et al.*, 2011) o de células de insecto (Ferreira-Gomes *et al.*, 2011).

El experimento fue realizado empleando un procedimiento similar al descrito para marcar ambos sitios de oclusión con  $^{86}\text{Rb}^+$ . Primeramente, se incubó la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa con  $250\text{ }\mu\text{M}$   $^{86}\text{Rb}^+$  en ausencia (control) y en presencia de 0,75; 1 o 1,25 g de alameticina/g de proteína total, durante 30 minutos a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Estas concentraciones de alameticina fueron elegidas tendiendo en cuenta aquéllas empleadas en el mencionado trabajo de Montes *et al.* (2011). Transcurrido ese tiempo, se mezcló 1 volumen de la suspensión con 19 volúmenes de una solución que contenía suficiente  $\text{Rb}^+$  no marcado y ATP para obtener concentraciones finales de  $250\text{ }\mu\text{M}$  y  $2\text{ mM}$ , respectivamente (produciéndose una dilución isotópica del  $^{86}\text{Rb}^+$  de 20 veces). Finalmente se realizaron determinaciones por duplicado de la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  retenido en la cámara de frenado y lavado ( $\text{Rb}_{\text{ret}}$ ) luego de 0,217; 16,6 y 300 segundos de efectuada la dilución. Los blancos fueron realizados empleando un medio de reacción sin enzima y descontados, por lo que  $\text{Rb}_{\text{ret}}$  equivale a la suma del  $^{86}\text{Rb}^+$  *ocluido* y de aquél *atrapado en vesículas*, de existir. La Figura V-1' muestra una simulación de los resultados esperados para la condición control sin tratar con alameticina (círculos) y para una condición en que las vesículas fuesen completamente permeables (triángulos).

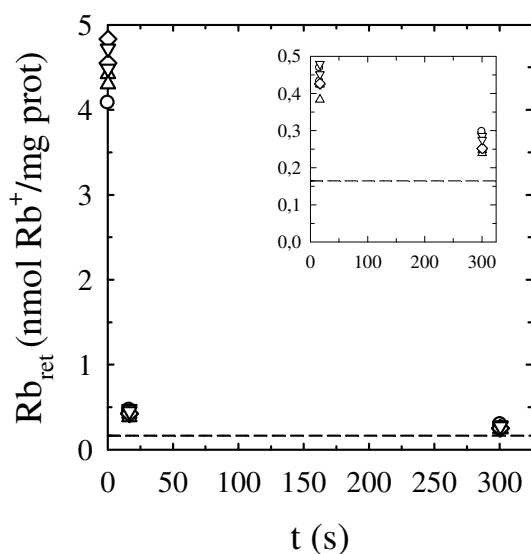


**Figura V-1'.** Simulación de la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  retenido en la cámara de frenado y lavado como función del tiempo, empleando una preparación de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa tratada ( $\triangle$ ) o no (condición control,  $\circ$ ) con alameticina, siguiendo el procedimiento experimental detallado en el texto. Los valores de  $\text{Rb}_{\text{ret}}$  para la condición control fueron calculados resolviendo la Ecuación V-3 luego de reemplazar sus parámetros por aquéllos que habían proporcionado el mejor ajuste a los resultados experimentales graficados con triángulos blancos en la Figura V-6 (ATP 2200  $\mu\text{M}$ ):  $A_1 = 4,37 \text{ nmol Rb}^+/\text{mg prot}$ ,  $A_2 = 0,68 \text{ nmol Rb}^+/\text{mg prot}$ ,  $A_3 = 0,22 \text{ nmol Rb}^+/\text{mg prot}$ ,  $\text{Rb}_{\text{ocl},\infty} = 0,165 \text{ nmol Rb}^+/\text{mg prot}$ ,  $k_1 = 1,51 \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2 = 0,238 \text{ s}^{-1}$  y  $k_3 = 0,00407 \text{ s}^{-1}$ . Para la preparación tratada con alameticina se procedió de igual manera pero suponiendo  $A_3 = 0$ . El gráfico inserto muestra los valores de  $\text{Rb}_{\text{ret}}$  menores que  $0,5 \text{ nmol Rb}^+/\text{mg prot}$ . La línea de trazo discontinuo indica la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido esperada a tiempo infinito teniendo en cuenta las concentraciones de  $\text{Rb}^+$  y ATP en el medio de reacción y la dilución isotópica efectuada.

Si el tratamiento con alameticina no alterara la capacidad de oclusión de la enzima, el resultado obtenido a los 0,217 segundos en la condición control debería diferenciarse del obtenido con la enzima tratada prácticamente sólo por el  $\text{Rb}^+$  presente en vesículas. Además, en presencia de alameticina, a los 16,6 y 300 segundos deberían obtenerse valores similares de  $\text{Rb}_{\text{ret}}$ , y coincidentes con la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido esperada a tiempo infinito teniendo en cuenta las concentraciones de  $\text{Rb}^+$  y ATP en el medio de reacción y la dilución isotópica efectuada.

Los resultados del experimento realizado se muestran en la Figura V-2'.





**Figura V-2'.** Cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  retenido en la cámara de frenado y lavado como función del tiempo, luego de promover su desoclusión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa siguiendo el procedimiento experimental detallado en el texto y empleando una preparación de enzima incubada con las siguientes concentraciones de alameticona (expresadas en g alameticona / g proteína total): 0 (control, ○), 0,75 (△), 1 (◇) o 1,25 (▽). El gráfico inserto muestra los valores de  $\text{Rb}_{\text{ret}}$  menores que 0,5 nmol  $\text{Rb}^+/\text{mg prot}$ . La línea de trazo discontinuo indica la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido esperada a tiempo infinito teniendo en cuenta las concentraciones de  $\text{Rb}^+$  y ATP en el medio de reacción y la dilución isotópica efectuada.

Puede verse que ninguna de las concentraciones de alameticona empleadas permitió obtener resultados diferentes de los obtenidos con la preparación control. Dado que existe abundante evidencia de la efectividad de la alameticona como agente permeabilizante en sistemas de diversa naturaleza y en concentraciones similares o menores a las utilizadas, los resultados sugieren que la lenta fase residual de liberación de  $^{86}\text{Rb}^+$  no correspondería a la salida de  $^{86}\text{Rb}^+$  del interior de vesículas remanentes en la preparación de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.

## **PARTE D**

# ***DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES***

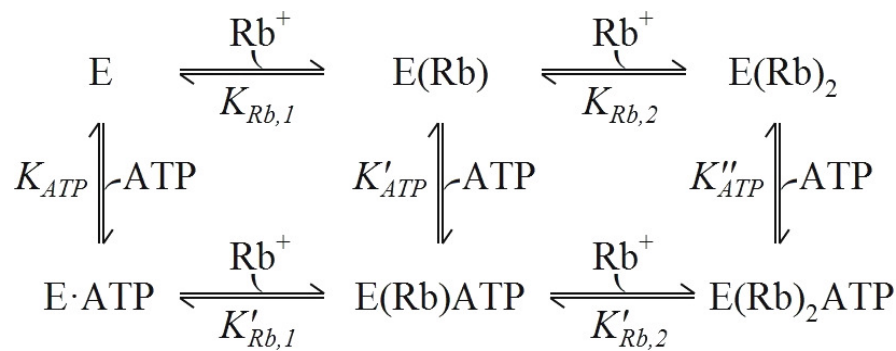


# CAPÍTULO VI

## *Aspectos relevantes que surgen del análisis de los resultados experimentales*

### *I. Efectos del $Rb^+$ y del ATP sobre la cantidad de $Rb^+$ ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico*

En el Capítulo III se estudió, empleando la ruta directa de oclusión, cómo varía la distribución entre el  $Rb^+$  libre y el ocluido en condiciones de equilibrio, en medios de incubación con diferentes concentraciones del catión y de ATP. Esta información fue empleada para construir un modelo mínimo que describe la interacción entre la  $Na^+/K^+$ -ATPasa, el  $Rb^+$  y el ATP, y que explica satisfactoriamente los resultados experimentales. Ese modelo se muestra a continuación:



**Esquema VI-1.** Modelo mínimo que describe el equilibrio entre  $Na^+/K^+$ -ATPasa,  $Rb^+$  y ATP cuando la oclusión de  $Rb^+$  ocurre a través de la ruta directa. Este modelo es idéntico al mostrado en el Esquema III-1.  $K$  simboliza la constante de disociación aparente del ligando indicado en el subíndice.

Los resultados experimentales, así como las conclusiones derivadas de su análisis y modelado, concuerdan con los publicados previamente por nuestro laboratorio (González-Lebrero *et al.*, 2002b).

En primer lugar se encontró que, en ausencia de ATP,  $Rb_{ocl}$  aumenta hiperbólicamente al incrementarse la concentración de  $Rb^+$  en el medio de reacción ( $K_{0,5} = 5,80 \pm 0,39 \mu M$ ), aún cuando se ocluyen dos moles de  $Rb^+$  por mol de enzima activa. Como se mostró al analizar estos resultados, el incremento hiperbólico puede ser explicado con el modelo secuencial y ordenado actualmente aceptado para describir la oclusión de  $Rb^+$  a través de la ruta directa (con los sitios de oclusión dispuestos en “fila india”, ver Figura I-2 de la Introducción). Sin embargo, se han presentado hipótesis alternativas para explicar la respuesta hiperbólica. Shani *et al.* (1987) propusieron que de los dos sitios de unión que presenta la  $Na^+/K^+$ -ATPasa, uno de ellos posee una afinidad tan elevada que se encuentra ocupado con todas las concentraciones de  $Rb^+$  por ellos ensayadas (10  $\mu M$  a 10 mM), permaneciendo el  $Rb^+$  unido pero no ocluido. El incremento de la concentración de  $Rb^+$  en el medio de reacción aumentaría la probabilidad de ocupación del segundo sitio, hecho que desencadenaría la oclusión de ambos iones. El incremento hiperbólico de  $Rb_{ocl}$  sería entonces consecuencia de que en el intervalo de concentraciones estudiadas por estos autores sólo se evidenciaba la titulación del segundo sitio. Como críticas a esta hipótesis podemos mencionar (1) que no se dispone de evidencia experimental que apoye la existencia de un sitio de unión para  $Rb^+$  de tan elevada afinidad (González-Lebrero *et al.* [2002a] muestran que el comportamiento hiperbólico se mantiene aún con concentraciones de  $Rb^+$  de 0,05  $\mu M$ ), y (2) que no contempla la formación de especies con un solo  $Rb^+$  ocluido, cuya existencia ha sido sugerida por los resultados de numerosos autores (ver, por ejemplo, González-Lebrero *et al.*, 2002a,b; Montes *et al.*, 2004 y 2006) y por experimentos mostrados en esta tesis.

En presencia de ATP, por otro lado, el incremento de  $Rb_{ocl}$  se produjo a lo largo de curvas sigmoides con valores de  $K_{0,5}$  que aumentaron progresivamente al aumentar la concentración de ATP, evidenciando una disminución de la afinidad aparente de la  $Na^+/K^+$ -ATPasa por el catión. La cantidad máxima de  $Rb^+$  ocluido no se vio modificada por el ATP y se obtuvieron, al igual que en ausencia del nucleótido, valores compatibles con una estequiometría de dos moles de  $Rb^+$  ocluido por mol de enzima activa, que

corresponde a una máxima ocupación de los sitios de unión/oclusión. Este resultado contrasta con experimentos de Shani *et al.* (1987), que mostraban que una concentración de ATP de 9,6 mM conducía a una cantidad máxima de  $\text{Rb}^+$  ocluido 25% inferior a la observada en ausencia del nucleótido. En esos experimentos, la cantidad de  $^{86}\text{Rb}^+$  ocluido fue determinada luego de hacer pasar la mezcla de reacción con enzima y  $^{86}\text{Rb}^+$  en equilibrio por una resina de intercambio catiónico a 0 °C para retener el  $^{86}\text{Rb}^+$  libre, proceso que requería 20 segundos. La aceleración de la velocidad de desoclusión inducida por el ATP podría generar una pérdida significativa de  $\text{Rb}^+$  ocluido durante los 20 segundos de tránsito por la resina, lo cual podría ser la razón del menor valor observado por estos autores.

El efecto del ATP sobre la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido puede ser explicado adecuadamente considerando la unión de una única molécula de ATP a la bomba. Esto concuerda con experimentos de diálisis en flujo que sugieren la existencia de un único sitio de unión al nucleótido (Hegyvary y Post, 1971; Nørby y Jensen, 1971). Los valores ajustados para la constante aparente de disociación del ATP de las especies sin  $\text{Rb}^+$  y de aquellas con dos  $\text{Rb}^+$  ocluidos (0,890 y 1680  $\mu\text{M}$  respectivamente, ver  $K_{\text{ATP}}$  y  $K''_{\text{ATP}}$  en la Tabla III-4) concuerdan con los valores publicados para la constante de disociación del sitio catalítico (Hegyvary y Post, 1971; Nørby y Jensen, 1971) y modulador (Forbush, 1987a; Kaufman *et al.*, 1999). Cabe aclarar que estudios cristalográficos de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de retículo sarcoplásmico (SERCA), extrapolables a otras P-ATPasas, sugieren que la propiedad catalítica o moduladora del ATP depende de su unión a un único sitio, y no de la unión a dos sitios diferentes simultáneamente presentes (Jensen *et al.*, 2006).

Tanto en presencia como en ausencia del nucleótido, el incremento de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  como función de la concentración de  $\text{Rb}^+$  mostró una pendiente inicial mayor a cero, hecho que permite postular que la enzima puede ocluir *un solo ion*  $\text{Rb}^+$  ya sea que esté unida o no a ATP. La formación de estados con un solo  $\text{Rb}^+$  ocluido a través de la ruta directa tiene abundante sustento experimental proveniente de medidas en equilibrio o cinéticas, pero se ha demostrado también que puede ser observada durante la ruta fisiológica de oclusión (Kaufman *et al.*, 2006).

La concentración de las formas enzimáticas que poseen  $\text{Rb}^+$  *unido pero no ocluido* es despreciable, ya sea que estén formando o no un complejo con el ATP. Por lo tanto, en el equilibrio, prácticamente todo el  $\text{Rb}^+$  unido se encuentra ocluido. Es importante

aclarar que el hecho de que nuestro análisis descarte la presencia de especies con  $\text{Rb}^+$  unido pero no ocluido no es consecuencia del uso de una técnica de medición que solamente cuantifica el  $\text{Rb}^+$  ocluido. Como se expuso en el anexo del Capítulo III, las ecuaciones que describen los sistemas en equilibrio termodinámico permiten deducir qué fracción representan las especies *detectadas* respecto del *total* de especies unidas a los mismos ligandos. Por lo tanto, aunque no se midan las especies con  $\text{Rb}^+$  unido, los resultados contienen idealmente toda la información necesaria para deducir su existencia. De hecho, a través de experimentos similares a los presentados en el mencionado capítulo, pero realizados en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  en lugar de ATP, en nuestro laboratorio se logró demostrar la existencia de formas unidas a  $\text{Mg}^{2+}$  que unen  $\text{Rb}^+$  pero que no pueden ocluirlo (González-Lebrero *et al.*, 2002b).

## ***II. Efectos del $\text{Rb}^+$ y del ATP sobre la cinética de oclusión de $\text{Rb}^+$ a través de la ruta directa***

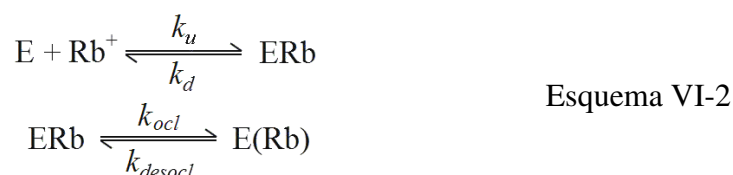
En el Capítulo IV se mostró cómo progresa en el tiempo la formación de los estados de la enzima que contienen  $\text{Rb}^+$  ocluido, empleando medios de reacción con diferentes concentraciones de  $\text{Rb}^+$  y de ATP. A continuación se discuten las características más relevantes de dicho fenómeno.

### ***Curso en el tiempo de la oclusión de $\text{Rb}^+$ en ausencia de ATP***

Las curvas de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido como función del tiempo llevadas a cabo en ausencia de ATP muestran que  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  aumenta hasta alcanzar un valor de equilibrio en un proceso bifásico, sugiriendo además la existencia de una tercera fase de oclusión muy rápida y de pequeña amplitud, que se completa en un tiempo inferior al menor tiempo evaluado (4 milisegundos). La mayor parte del aumento de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  se registró durante la fase rápida cuando se emplearon concentraciones de  $\text{Rb}^+$  superiores a 7  $\mu\text{M}$ . Cuando la concentración de  $\text{Rb}^+$  tendió a infinito, la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en esta fase tendió hiperbólicamente a un valor de  $3,98 \pm 0,18$  nmol de  $\text{Rb}^+$ /(mg proteína) que corresponde a más de un ion  $\text{Rb}^+$  ocluido por unidad de enzima activa.

Los valores del coeficiente de velocidad de la fase rápida mostraron un incremento lineal con la concentración de  $\text{Rb}^+$ . En cambio, no se observó una marcada variación del coeficiente de velocidad de la fase lenta en el intervalo de concentraciones estudiado.

La velocidad de aumento de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  para tiempos cercanos a cero ( $v_{\text{ocl}}$ ) se relacionó de manera prácticamente lineal con la concentración de  $\text{Rb}^+$  presente en el medio de reacción. Se mostró que ese comportamiento puede ser explicado suponiendo que, en los instantes iniciales del proceso de oclusión, ocurre una unión rápida del catión a la enzima, seguida por un cambio conformacional que lleva el catión al estado ocluido. Estas reacciones se muestran en el siguiente esquema:



El Esquema VI-2 es idéntico al IV-1, y  $k_u$ ,  $k_d$ ,  $k_{\text{ocl}}$  y  $k_{\text{desocl}}$  representan las constantes de velocidad de unión, disociación, oclusión y desoclusión del  $\text{Rb}^+$ , respectivamente. Suponiendo que la primera reacción está en equilibrio en todo momento (y que su constante de equilibrio,  $k_d/k_u$ , es igual a 2981  $\mu\text{M}$  –González-Lebrero *et al.*, 2002a), pudo estimarse  $k_{\text{ocl}}$  en 134  $\text{s}^{-1}$ . Si bien este modelo predice que  $v_{\text{ocl}}$  dependerá hipérbolicamente de la concentración de  $\text{Rb}^+$ , el incremento de  $v_{\text{ocl}}$  tenderá a ser lineal cuando la concentración de  $\text{Rb}^+$  sea muy inferior a  $k_d/k_u$ . Empleando un intervalo de concentraciones de  $\text{K}^+$  más amplio (1 a 25 mM) y  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa marcada con una sonda fluorescente, Steinberg y Karlsh (1989) mostraron que la velocidad del cambio conformacional de la forma con  $\text{K}^+$  unido a aquélla con  $\text{K}^+$  ocluido depende hipérbolicamente de la concentración del catión ( $K_{0,5} = 10,9 \pm 1,7$  mM), obteniendo para  $k_{\text{ocl}}$  un valor de  $271 \pm 19$   $\text{s}^{-1}$ .

### ***Curso en el tiempo de la oclusión de $\text{Rb}^+$ en presencia de ATP***

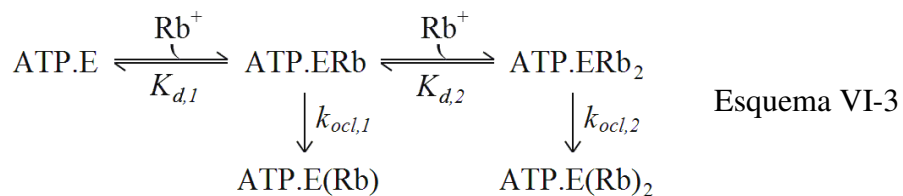
En presencia de 200  $\mu\text{M}$  ATP, el incremento de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  también fue predominantemente bifásico. En forma general, la evolución de las amplitudes de las fases en respuesta a cambios en la concentración de  $\text{Rb}^+$  fue cualitativamente similar a la observada en



ausencia del nucleótido, aunque fue posible observar una disminución en la afinidad aparente por el catión. El incremento de  $Rb_{ocl}$  correspondió mayoritariamente a la fase rápida, y la cantidad de  $Rb^+$  ocluido durante esta fase superó la observada en ausencia del nucleótido para concentraciones de  $Rb^+$  mayores que 250  $\mu M$ . En esos experimentos el ATP fue incubado con la ATPasa antes del agregado de  $Rb^+$ . Se sabe que el ATP promueve el cambio conformacional  $E_2 \rightarrow E_1$ , por lo que se esperaría que la presencia de ATP llevara a que la mayor parte de la enzima se encontrara en la conformación  $E_1$  al momento de agregar el catión al medio de reacción. La mayor amplitud de la fase rápida respecto de la observada en ausencia de ATP podría estar relacionada entonces a que una mayor cantidad de  $Rb^+$  se ocluye a través de una ruta que involucra la unión a  $E_1$  y su posterior oclusión.

El coeficiente de velocidad de la fase rápida ( $k_1$ ) varió linealmente con la concentración de  $Rb^+$ , y los valores ajustados fueron similares a los obtenidos en medios libres de ATP. Los valores del coeficiente  $k_2$  también aumentaron al incrementarse la concentración de  $Rb^+$  empleada, y resultaron en todos los casos mayores a los obtenidos en ausencia de ATP. La evolución tanto de  $k_1$  como de  $k_2$  en presencia de ATP concuerda con la observada al estudiar la oclusión de  $Rb^+$  en presencia de la sonda fluorescente eosina-Y (Montes *et al.*, 2006), la cual puede competir con el ATP por la unión al sitio de alta afinidad de la  $Na^+/K^+$ -ATPasa (Skou y Esmann, 1981; Esmann, 1992). Como se mencionó al comienzo del Capítulo IV, esta sonda también genera efectos análogos a los del ATP sobre la velocidad de desoclusión y los niveles de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio (Montes *et al.*, 2004).

Cuando la concentración de ATP es suficiente para saturar sus sitios de unión, el aumento de la concentración de  $Rb^+$  se asocia con un aumento de  $v_{ocl}$  que puede ser explicado con el modelo del Esquema IV-2, que reproducimos a continuación:



Recordemos que  $K_{d,1}$  y  $K_{d,2}$  representan las constantes de disociación del primer y del segundo ion  $\text{Rb}^+$ , respectivamente, y que  $k_{ocl,1}$  y  $k_{ocl,2}$  representan las constantes de velocidad de oclusión. El modelo predice que  $v_{ocl}$  debería aumentar a lo largo de una curva sigmoide al incrementarse la concentración de  $\text{Rb}^+$ , de acuerdo con la siguiente función:

$$v_{ocl} = \frac{k_{ocl,1}K_{d,2}[\text{Rb}^+] + 2k_{ocl,2}[\text{Rb}^+]^2}{K_{d,1}K_{d,2} + K_{d,2}[\text{Rb}^+] + [\text{Rb}^+]^2} E_T \quad \text{Ecuación VI-1}$$

Esta dependencia sigmoide de  $v_{ocl}$  no sugiere necesariamente que los sitios de unión a  $\text{Rb}^+$  posean afinidades intrínsecamente diferentes, o que exista una interacción positiva entre ellos. Debido a la existencia de los factores  $k_{ocl,1}$  y  $k_{ocl,2}$  en el numerador de la Ecuación VI-1, puede demostrarse que los sitios de unión a  $\text{Rb}^+$  podrían comportarse como idénticos y no interactuantes ( $K_{d,2} = 4K_{d,1}$ ) y verificarse una evolución sigmoide siempre que fuese  $k_{ocl,2}$  mayor a  $2k_{ocl,1}$ .

Los resultados experimentales permitieron estimar  $k_{ocl,1}$  y  $K_{d,1}$  en  $3,0 \text{ s}^{-1}$  y  $760 \text{ }\mu\text{M}$ . Es importante notar, en primer lugar, que  $k_{ocl,1}$  es marcadamente menor que la constante de oclusión obtenida en ausencia de ATP ( $134 \text{ s}^{-1}$ , ver sección anterior). En segundo lugar, si los sitios de unión pudiesen ser considerados idénticos, la constante de disociación *intrínseca* de cada uno de ellos sería igual a  $2K_{d,1}$  ( $1520 \text{ }\mu\text{M}$ ). Este resultado no difiere mucho del valor de  $2981 \text{ }\mu\text{M}$  hallado previamente en nuestro laboratorio para medios de incubación sin ATP (González-Lebrero *et al.*, 2002a).

Finalmente, el Esquema VI-3 sugiere que en presencia de ATP debe ser posible que se formen especies con dos iones  $\text{Rb}^+$  ocluidos ya en los instantes iniciales de la reacción. Con esto se concluye que ambos sitios de unión al catión deben ser accesibles más o menos simultáneamente.

Cuando se realizaron experimentos empleando una única concentración de  $\text{Rb}^+$  y diferentes concentraciones de ATP, incrementos en la concentración de ATP generaron una disminución o un aumento de  $v_{ocl}$  cuando la concentración de  $\text{Rb}^+$  fue inferior o superior a  $499 \text{ }\mu\text{M}$ , respectivamente. Las curvas de  $v_{ocl}$  *versus*  $[\text{ATP}]$  fueron adecuadamente descriptas por funciones hiperbólicas, lo cual justifica que en el Esquema VI-3 la enzima esté unida a una sola molécula de ATP.

La *disminución* de  $v_{ocl}$  causada por el ATP en medios de incubación con concentraciones de  $Rb^+$  inferiores a 499  $\mu M$  concuerda con resultados de Montes *et al.* (2004) obtenidos empleando eosina-Y y una concentración de  $Rb^+$  de 100  $\mu M$ . Sus experimentos muestran que esta sonda lleva  $v_{ocl}$  a la mitad del valor observado en su ausencia con una  $K_{0,5}$  de 0,25  $\mu M$ . En el mismo trabajo se muestra que, si bien cada unidad de enzima puede unir dos moléculas de eosina, la unión de una sola molécula es suficiente para producir el efecto máximo sobre  $v_{ocl}$ .

Por otro lado, el *incremento* de  $v_{ocl}$  causado por el ATP que observamos al emplear una concentración de  $Rb^+$  de 900  $\mu M$  tiene un antecedente en resultados de Hasenauer *et al.* (1993). Estos autores informaron que a 4 °C y en medios de reacción conteniendo 3  $\mu M$   $Rb^+$ , un incremento en la concentración de ATP generaba un incremento de la cantidad de  $Rb^+$  ocluido a los 15 minutos de incubación (en estas condiciones, eran necesarias aproximadamente 24 horas para que el sistema alcanzara el equilibrio).

En un trabajo de 1989, Steinberg y Karlish informaron que no se observaba, mediante determinaciones de la fluorescencia extrínseca de la  $Na^+/K^+$ -ATPasa, un efecto significativo del ATP sobre la velocidad de oclusión de  $K^+$  a temperatura ambiente, empleando 5  $\mu M$  ATP y 1 o 10 mM  $K^+$ . En estos experimentos no se incubó la enzima con el ATP antes del agregado de  $K^+$ , por lo que la observación de algún efecto del ATP requería que su unión a la enzima fuese suficientemente rápida comparada con la velocidad de oclusión. Sin embargo, experimentos comentados en Materiales y Métodos (“Cálculo de la velocidad inicial de oclusión de  $Rb^+$ ”) permiten concluir que eso no es así, al menos cuando se emplea  $Rb^+$  en concentraciones iguales o superiores a 900  $\mu M$ . Por lo tanto, es posible que un insuficiente tiempo de interacción entre la enzima y el nucleótido explique la falta de efecto del ATP en el mencionado estudio.

### ***III. Efectos del $Rb^+$ y del ATP sobre la cinética de desoclusión de $Rb^+$***

En el Capítulo V se caracterizó la cinética de liberación de  $^{86}Rb^+$  que había sido ocluido empleando la ruta directa, en medios de reacción con diferentes concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP. Discutiremos a continuación las observaciones más importantes.

***Curso en el tiempo de la desoclusión de  $\text{Rb}^+$  en ausencia de ATP***

La liberación de  $\text{Rb}^+$  desde el estado ocluido en medios de incubación libres de ATP tuvo lugar en dos fases de amplitudes similares. Se observó que los coeficientes de velocidad de la fase rápida ( $k_1$ ) y de la fase lenta ( $k_2$ ) decrecían hiperbólicamente cuando se incrementaba la concentración de  $\text{Rb}^+$  en el medio de reacción, aunque de manera mucho más marcada en el caso de  $k_2$ . Ambos coeficientes tendieron a valores mayores a cero cuando la concentración de  $\text{Rb}^+$  tendió a infinito. Los valores de  $K_{0,5}$  para la disminución de  $k_1$  y  $k_2$  fueron  $5,6 \pm 3,4 \mu\text{M}$  y  $6,4 \pm 1,6 \mu\text{M}$  respectivamente.

Se ha demostrado que el  $\text{Rb}^+$  que tiene efecto sobre  $k_2$  se encuentra ocluido (Glynn *et al.*, 1985; Forbush, 1987b), lo que explica la similitud entre los valores de  $K_{0,5}$  de la disminución de  $k_2$  y del incremento de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el equilibrio respecto de la concentración de  $\text{Rb}^+$ . La disminución de  $k_1$  y de  $k_2$  con el incremento de la concentración de  $\text{Rb}^+$  coincide con las predicciones del ya mencionado modelo cinético propuesto por González-Lebrero *et al.* (2002a) para describir la desoclusión y la oclusión de  $\text{Rb}^+$  a través de la ruta directa y en ausencia de otros ligandos de la enzima (ver Introducción, Figura I-2).

***Curso en el tiempo de la desoclusión de  $\text{Rb}^+$  en presencia de ATP***

La liberación del  $\text{Rb}^+$  ocluido en medios de reacción conteniendo diferentes concentraciones de ATP (entre 0 y 2 mM) y una concentración de  $\text{Rb}^+$  de 250  $\mu\text{M}$  tuvo lugar principalmente en dos fases. La amplitud de la fase rápida resultó, como se mencionó antes, similar a la de la fase lenta en ausencia de ATP, y aumentó progresivamente al incrementarse la concentración del nucleótido hasta representar aproximadamente un 80 % del cambio máximo en  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$ .

La observación de múltiples fases en la desoclusión de  $\text{Rb}^+$  está de acuerdo con trabajos de Forbush (1987a) y de González-Lebrero *et al.* (2002a) donde se informa que se obtienen curvas de desoclusión con al menos dos fases en presencia de ATP,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Na}^+$ , y que la fase rápida es la de mayor amplitud. En el segundo trabajo se informa además que el coeficiente de velocidad de la segunda fase es demasiado pequeño para ser cinéticamente compatible con la actividad de la bomba, por lo que se concluye que

esa fase representaría una ruta de desoclusión no ligada al funcionamiento fisiológico de la enzima. Si tenemos en cuenta que el rol fisiológico de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es transportar  $\text{K}^+$  hacia el interior celular, debemos suponer que la liberación del  $\text{K}^+$  ocluido (y de sus congéneres) promovida por ATP tiene lugar hacia el lado *intracelular* de la bomba. Esta suposición está justificada por experimentos de Glynn *et al.* (1987) que demuestran que existe una estrecha correlación entre los coeficientes de velocidad de la desoclusión de  $\text{Rb}^+$ ,  $\text{Cs}^+$  y  $\text{Tl}^+$  y la del cambio conformacional  $E_2 \rightarrow E_1$  en presencia de ATP. Por lo tanto, un mecanismo que explique las fases de desoclusión adicionales podría ser la liberación de una fracción minoritaria de los iones ocluidos hacia la cara *extracelular* de la enzima.

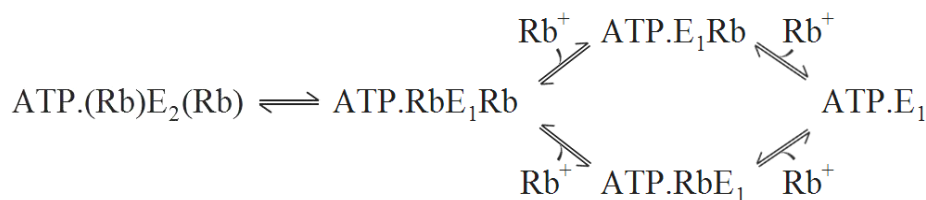
El incremento de la concentración del nucleótido también indujo un aumento de los coeficientes de velocidad de las dos fases mayoritarias, y dicho aumento fue bien descripto por una hipérbola equilátera con un valor de  $K_{0,5}$  de  $214 \pm 30 \mu\text{M}$  ( $k_1$ ) y  $72 \pm 21 \mu\text{M}$  ( $k_2$ ). Este efecto del ATP es consistente con la ya aceptada acción desestabilizadora del nucleótido sobre los estados con  $\text{K}^+$  (o sus congéneres) ocluido, y los valores de  $K_{0,5}$  sugieren que el ATP se une a un sitio de baja afinidad, hecho compatible con la interacción con formas de la enzima con  $\text{Rb}^+$  ocluido. El valor de  $K_{0,5}$  para el incremento de  $k_1$  coincide con el hallado por Forbush (1987a) y por González-Lebrero *et al.* (2002a) empleando NaMgATP. En el primer trabajo se demuestra además que la afinidad aparente por el nucleótido no se ve modificada si se omite el agregado de  $\text{Mg}^{2+}$ . Es notable, sin embargo, que el valor máximo de  $k_1$  calculado a partir de nuestros experimentos es aproximadamente 10 veces inferior al informado por Forbush empleando ATP en presencia de  $\text{Na}^+$ . Dado que el  $\text{Na}^+$  en una concentración de 100 mM no modifica la velocidad de desoclusión de  $\text{Rb}^+$  (Forbush, 1987b), la diferencia observada debe indicar un efecto sinérgico del ATP y el  $\text{Na}^+$  para acelerar la desoclusión de  $\text{Rb}^+$ .

La liberación del  $\text{Rb}^+$  ocluido en medios de reacción conteniendo 2 mM ATP y diferentes concentraciones del catión también tuvo lugar mayoritariamente en dos fases, cuya amplitud pareció ser independiente de la concentración de  $\text{Rb}^+$  empleada, siendo la amplitud de la fase rápida aproximadamente 5 veces superior a la de la fase lenta. Los coeficientes de velocidad de cada fase tampoco se vieron modificados notablemente al

variar la concentración del catión, y se obtuvieron en todos los casos valores superiores a los observados en medios de reacción libres de ATP.

La independencia del valor de  $k_2$  respecto de la concentración de  $\text{Rb}^+$  contrasta con lo observado en ausencia de ATP, donde la velocidad de la segunda fase mostró una disminución progresiva al incrementarse la concentración de  $\text{Rb}^+$ . Similares resultados fueron publicados por Forbush (1987b) y sugieren que la unión de ATP a la enzima conduce a una pérdida del orden en la liberación del  $\text{Rb}^+$  ocluido, lo cual eliminaría la posibilidad de que el  $\text{Rb}^+$  presente en el medio de reacción “bloquee” la liberación del segundo  $\text{Rb}^+$ . Una fuerte evidencia a favor de esa conclusión es que se obtuvieron curvas de desoclusión superponibles cuando se estudió la liberación de  $^{86}\text{Rb}^+$  localizado selectivamente en uno u otro de los sitios de oclusión, en medios de incubación con una concentración de ATP de 2 mM.

Anteriormente mencionamos que un trabajo de Glynn *et al.* (1987) sugiere que la liberación del  $\text{Rb}^+$  ocluido promovida por ATP está orientada hacia el lado intracelular de la ATPasa, y que la velocidad de desoclusión está limitada por la velocidad del cambio conformacional  $E_2 \rightarrow E_1$ . Debe suponerse entonces que, una vez ocurrido el cambio conformacional, la liberación de ambos iones ocluidos es muy rápida, lo cual permite explicar la aparente falta de un orden de liberación. El mecanismo más sencillo para describir el proceso es que el cambio conformacional conduce a la exposición *simultánea* de los sitios de oclusión hacia la cara citoplasmática de la ATPasa, teniendo ambos iones ocluidos igual probabilidad de disociarse (con una velocidad que estaría controlada por difusión), como muestra el siguiente esquema:



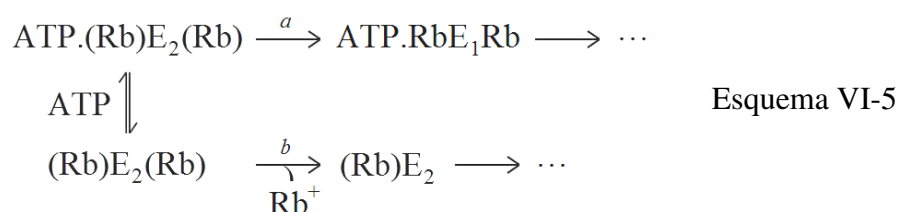
Esquema IV-4

Al igual que en esquemas anteriores, el  $\text{Rb}^+$  mostrado entre paréntesis se encuentra ocluido. Según este modelo, la disociación del  $\text{Rb}^+$  no sería un paso limitante, por lo que

podría esperarse que la desestabilización de las formas enzimáticas con  $\text{Rb}^+$  ocluido causada por el ATP dependiera fundamentalmente de una aceleración del cambio conformacional que transforma  $(\text{Rb})\text{E}_2(\text{Rb})$  en  $\text{RbE}_1\text{Rb}$  más que a una disminución de la afinidad de los sitios por el  $\text{Rb}^+$ .

Podría concluirse que la exposición simultánea de los sitios anula también la posibilidad de que exista un orden en la unión de  $\text{Rb}^+$  desde el medio intracelular. Sin embargo, existe evidencia experimental que sugiere que la unión de tres  $\text{Na}^+$  al conformero  $\text{E}_1$  ocurre de manera secuencial y ordenada (ver Introducción: “*Estudio de la desoclusión y oclusión de  $\text{K}^+$  por la ruta directa*”), lo cual parecería estar en desacuerdo con esta conclusión. No obstante, un trabajo de Kanai *et al.* (2013) permite suponer que existen distintos mecanismos implicados en la unión de  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$  desde el medio intracelular: con base en evidencia cristalográfica, estos autores han propuesto (1) que existe un importante cambio conformacional entre la disociación de  $\text{K}^+$  de  $\text{E}_1$  y la unión de  $\text{Na}^+$ , (2) que la vía por la que el  $\text{Na}^+$  accede a sus sitios no admite el ingreso de  $\text{K}^+$ , y (3) que se requiere una secuencia de cambios conformacionales para la unión ordenada de los tres iones  $\text{Na}^+$ , y que esta secuencia no puede ser promovida por  $\text{K}^+$ . Esto sugiere que la unión de  $\text{K}^+$  (o sus congéneres) desde el medio intracelular podría no ser secuencial y ordenada, aunque la del  $\text{Na}^+$  lo sea.

La desoclusión a través de la ruta propuesta en el Esquema VI-4 da lugar a una disminución de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el tiempo que es descrita por una única función exponencial. La observación de fases adicionales en los resultados podría responder a que la máxima concentración de ATP empleada (2 mM) no es suficiente para que los sitios de unión a ATP de la forma  $(\text{Rb})\text{E}_2(\text{Rb})$  estén saturados. Al respecto, recordemos que a través del análisis del efecto del ATP sobre la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en el equilibrio obtuvimos un valor de  $(1,68 \pm 0,26) \cdot 10^3 \mu\text{M}$  para la constante de disociación del ATP de las formas con dos  $\text{Rb}^+$  ocluidos ( $K'_{\text{ATP}}$  en Esquema III-1 y Tabla III-4). El  $\text{Rb}^+$  ocluido en la fracción de  $(\text{Rb})\text{E}_2(\text{Rb})$  unida a ATP seguiría la vía de desoclusión descrita (Esquema VI-4), y el ocluido en las formas no unidas a ATP seguiría otra ruta, posiblemente la vía secuencial y ordenada hacia el lado extracelular que predomina en medios de reacción sin ATP (ver Introducción, flechas continuas en la Figura I-2). Lo dicho se esquematiza en el siguiente modelo:



La reacción  $a$  puede ser considerada irreversible si suponemos que la disociación del  $\text{Rb}^+$  unido a  $\text{ATP} \cdot \text{RbE}_1\text{Rb}$  es muy rápida, y la reacción  $b$  sería prácticamente irreversible debido a la dilución isotópica efectuada. Sin embargo, postular la existencia de las reacciones paralelas  $a$  y  $b$  no es suficiente para explicar las múltiples fases. Las constantes de velocidad que gobiernan la unión y disociación del ATP de  $(\text{Rb})\text{E}_2(\text{Rb})$  son mucho mayores que las constantes de desoclusión  $a$  y  $b$ , por lo que podemos suponer que el ATP se une en equilibrio rápido a dicha especie (Kaufman *et al.*, 1999). En ese caso,  $(\text{Rb})\text{E}_2(\text{Rb})$  y  $\text{ATP} \cdot (\text{Rb})\text{E}_2(\text{Rb})$  se comportarán como una única especie, cuya desaparición se producirá a lo largo de una sola fase exponencial gobernada por un coeficiente aparente igual a

$$a \cdot f_{\text{ATP}} + b \cdot (1 - f_{\text{ATP}})$$

siendo  $f_{\text{ATP}}$  igual al cociente  $[\text{ATP} \cdot (\text{Rb})\text{E}_2(\text{Rb})] / [(\text{Rb})\text{E}_2(\text{Rb})] + [\text{ATP} \cdot (\text{Rb})\text{E}_2(\text{Rb})]$ . Esta fase correspondería a la fase rápida observada en los experimentos. La fase lenta podría corresponder entonces a la liberación de  $\text{Rb}^+$  por  $(\text{Rb})\text{E}_2$ , que es la única especie que conserva  $\text{Rb}^+$  ocluido. Como la velocidad de esta fase es superior a la observada en medios de reacción carentes de ATP, suponemos que la desoclusión es precedida y promovida por la unión de  $(\text{Rb})\text{E}_2$  al nucleótido.





---

# CAPÍTULO VII

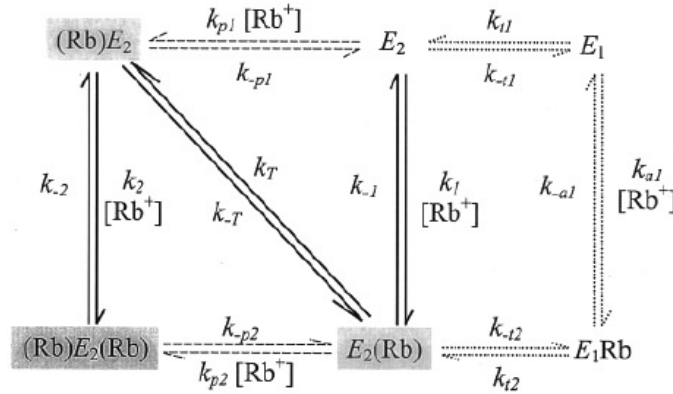
## *Un modelo de la interacción entre $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, $\text{Rb}^+$ y ATP*

Teniendo en cuenta el análisis de los resultados desarrollado en los capítulos previos, nos propusimos construir un modelo detallado que describiera la interacción entre  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa,  $\text{Rb}^+$  y ATP, que lograra reproducir simultáneamente toda la información experimental presentada a lo largo de esta tesis.

Los resultados obtenidos *en ausencia de ATP* pueden ser explicados con el modelo cinético propuesto por González-Lebrero *et al.* (2002a) para describir la desoclusión y la oclusión de  $\text{Rb}^+$  a través de la ruta directa y en ausencia de otros ligandos de la ATPasa (ver Figura VII-1). Este modelo ya fue presentado en la Introducción (Figura I-2), y es similar a aquéllos propuestos por Glynn *et al.* (1985) y por Forbush (1987b) para explicar la desoclusión de  $\text{Rb}^+$  inducida por ortofosfato en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$ .

Como se mencionó en la Introducción, este modelo presenta la oclusión como un proceso predominantemente *secuencial y ordenado* (flechas de trazo continuo), ya que la oclusión de los iones no ocurre simultáneamente y la oclusión del primer ion siempre ocurre en el mismo sitio, que en el esquema está localizado a la derecha del intermediario  $E_2$ . Este sitio (que llamamos sitio *f* para respetar la nomenclatura empleada por Forbush) sería el único inmediatamente accesible desde el medio de incubación y estaría asociado a las fases rápidas en las curvas de oclusión y desoclusión. La oclusión del segundo ion requiere que el primero se trasloque al sitio más profundo (ubicado a la izquierda en el esquema, y que llamamos sitio *s*). Si esta reacción (representada por la constante  $k_T$ ) no es suficientemente rápida, el incremento de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el tiempo seguirá dos fases de amplitudes similares: una más rápida, correspondiente al primer ion y cuya velocidad aumentará con la concentración de  $\text{Rb}^+$  en el medio de

incubación, y una más lenta asociada al segundo  $\text{Rb}^+$ . De manera similar, la liberación del  $\text{Rb}^+$  ocluido en el sitio *s* sólo puede ocurrir después de la del  $\text{Rb}^+$  localizado en el sitio *f*. La velocidad de liberación de aquél podría estar limitada por un valor pequeño de  $k_{-T}$  o por la probabilidad de que el sitio *f* esté ocupado. Esta probabilidad aumenta si se incrementa la concentración de  $\text{Rb}^+$  en el medio de reacción, llevando a un enlentecimiento de la desoclusión de la mitad del total de  $\text{Rb}^+$  ocluido. La liberación ordenada que describimos ocurriría hacia la cara *extracelular* de la ATPasa tanto en medios de reacción donde el  $\text{Rb}^+$  es su único ligando como en presencia de fosfato y  $\text{Mg}^{2+}$  (Forbush 1987b; González-Lebrero *et al.*, 2008).



**Figura VII-1.** Modelo que describe la desoclusión y la oclusión de  $\text{Rb}^+$  a través de la ruta directa, propuesto por González-Lebrero *et al.* (2002a), mostrado previamente en la Figura I-2. Las especies resaltadas son aquellas donde el  $\text{Rb}^+$  se encuentra ocluido. Las posiciones a la derecha y a la izquierda  $\text{E}_2$  representan, respectivamente, el sitio de oclusión más próximo o más alejado de la cara extracelular de la enzima. Los valores de las constantes de velocidad que proporcionaron el mejor ajuste del modelo a los resultados experimentales se detallan en la Figura I-2.

Las flechas de trazo discontinuo que conectan  $(\text{Rb})\text{E}_2$  con  $\text{E}_2$  y  $(\text{Rb})\text{E}_2(\text{Rb})$  con  $\text{E}_2(\text{Rb})$  representan reacciones que permiten que el  $\text{Rb}^+$  ocluido en el sitio *s* sea liberado en condiciones en que el sitio *f* se encuentra ocupado. Estas reacciones tienen por objeto explicar que cuando la concentración externa de  $\text{Rb}^+$  tiende a infinito, y por lo tanto la probabilidad de ocupación del sitio *f* tiende a uno, la velocidad de la fase lenta de desoclusión no tiende a cero (ver Capítulo V, Figura V-2). Resultados publicados por Post *et al.* (1972) y por Forbush (1987b) analizados en conjunto sugieren que la

desoclusión que tiene lugar desde el sitio *s* cuando el sitio *f* está ocupado se produce hacia la cara *intracelular* de la ATPasa.

Las reacciones representadas por flechas punteadas (sector derecho del esquema) muestran una vía alternativa de oclusión, que implica la unión de  $\text{Rb}^+$  a sitios citoplasmáticos de baja afinidad presentados por el intermediario  $E_1$  y el cambio conformacional a la forma  $E_2$  que lleva a la oclusión del catión. La hipótesis de la existencia de esta ruta de oclusión encuentra sustento en experimentos de Karlsh y Pick (1981), quienes mostraron, empleando  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa reconstituida en proteolipasomas, que sólo el  $\text{K}^+$  en contacto con la cara citoplasmática de la enzima permite obtener una cinética de digestión con tripsina y niveles de inhibición por vanadato compatibles con los obtenidos con las formas enzimáticas que contienen  $\text{K}^+$  ocluido. Además, es consistente con la baja afinidad con que el  $\text{Rb}^+$  promueve el incremento de la velocidad inicial de oclusión (ver Capítulo IV, sección IV).

El modelo de la Figura VII-1, sin embargo, no permite explicar que la fase rápida observada durante la oclusión de  $\text{Rb}^+$  tenga una amplitud mayor que la de la fase lenta y correspondiente a la oclusión de más de 1 mol de  $\text{Rb}^+$  por mol de enzima activa. Para reproducir ese comportamiento debería postularse la existencia de uno o más pasos que permitan que parte del  $\text{Rb}^+$  acceda rápidamente al sitio *s*, sin atravesar el paso lento de traslocación. Pudimos verificar mediante ajustes del modelo a los resultados experimentales que las reacciones caracterizadas por las constantes  $k_{p1}$  y  $k_{p2}$  no proveen un camino que cumpla con ese requisito. En cambio, pueden obtenerse cursos en el tiempo donde más de un  $\text{Rb}^+$  es ocluido por unidad de enzima durante la fase rápida si se postula que  $E_1\text{Rb}$  puede unir un ion  $\text{Rb}^+$  adicional para dar la especie  $\text{Rb}E_1\text{Rb}$ , que puede luego convertirse en  $(\text{Rb})E_2(\text{Rb})$ . Al discutir la dependencia sigmoide de la curva de  $v_{ocl}$  versus  $[\text{Rb}^+]$  en *presencia* de ATP, mencionamos que debían existir especies con dos iones  $\text{Rb}^+$  ocluidos ya en los primeros instantes de la reacción (ver Esquema VI-3). No hay evidencia que permita descartar que lo mismo suceda en *ausencia* del nucleótido: la Figura IV-8 muestra que  $v_{ocl}$  se relaciona linealmente con la concentración de  $\text{Rb}^+$  en ausencia de ATP, pero ésta bien podría ser la porción inicial de una curva sigmoide de muy baja afinidad.

En presencia de ATP, las curvas de oclusión y de desoclusión son cualitativamente similares a las obtenidas en su ausencia, por lo que ellas también podrían ser explicadas

empleando un modelo similar al de la Figura VII-1, que incluya reacciones que permitan reproducir el incremento sigmoide de  $v_{ocl}$  con la concentración de  $\text{Rb}^+$  (Esquema VI-3) y la liberación *al azar* de los iones ocluidos (Esquema VI-4).

Considerando todo lo discutido hasta aquí, construimos un modelo para explicar la interacción entre la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, el  $\text{Rb}^+$  y el ATP, que se muestra en la Figura VII-2. Éste está basado en el modelo presentado en la Figura VII-1, en los modelos de los Esquemas VI-3 y VI-4, y en el modelo del Esquema III-1 que permite explicar la evolución de las medidas de  $\text{Rb}_{ocl}$  en condiciones de equilibrio. Sólo a los fines de facilitar la representación gráfica de las reacciones, el modelo se muestra como dos sub-modelos que se caracterizan por el hecho de que, en el primero (A) ninguna de las especies está unida a ATP, y en el segundo (B) todas lo están. Toda especie de uno de los sub-modelos (por ejemplo,  $\text{RbE}_1$ ) está vinculada a la especie correspondiente del otro ( $\text{RbE}_1.\text{ATP}$ ) a través de la unión o disociación de ATP. Esto está indicado por la reacción C, donde  $Q$  y  $Q.\text{ATP}$  representan cualquier especie de los sub-modelos A y B, respectivamente.

En el modelo, las posiciones a la izquierda y a la derecha de cada especie corresponden a uno u otro de los sitios de unión/oclusión de  $\text{Rb}^+$ , y los paréntesis alrededor del  $\text{Rb}^+$  indican que el ion se encuentra ocluido. El sitio de la derecha sería el más próximo a la porción extracelular de la enzima y el  $\text{Rb}^+$  allí ocluido es el que se intercambia más rápidamente con  $\text{Rb}^+$  libre en el medio de incubación cuando la desoclusión tiene lugar en ausencia de ATP. Nótese que las reacciones de unión y de oclusión de  $\text{Rb}^+$  por las formas  $E_2$ , o  $E_x$  (ver más adelante), se combinan en un solo paso. Puede constatarse que las reacciones que vinculan las especies en conformación  $E_2$  en el sub-modelo A se corresponden con las representadas con flechas continuas en el modelo de la Figura VII-1.

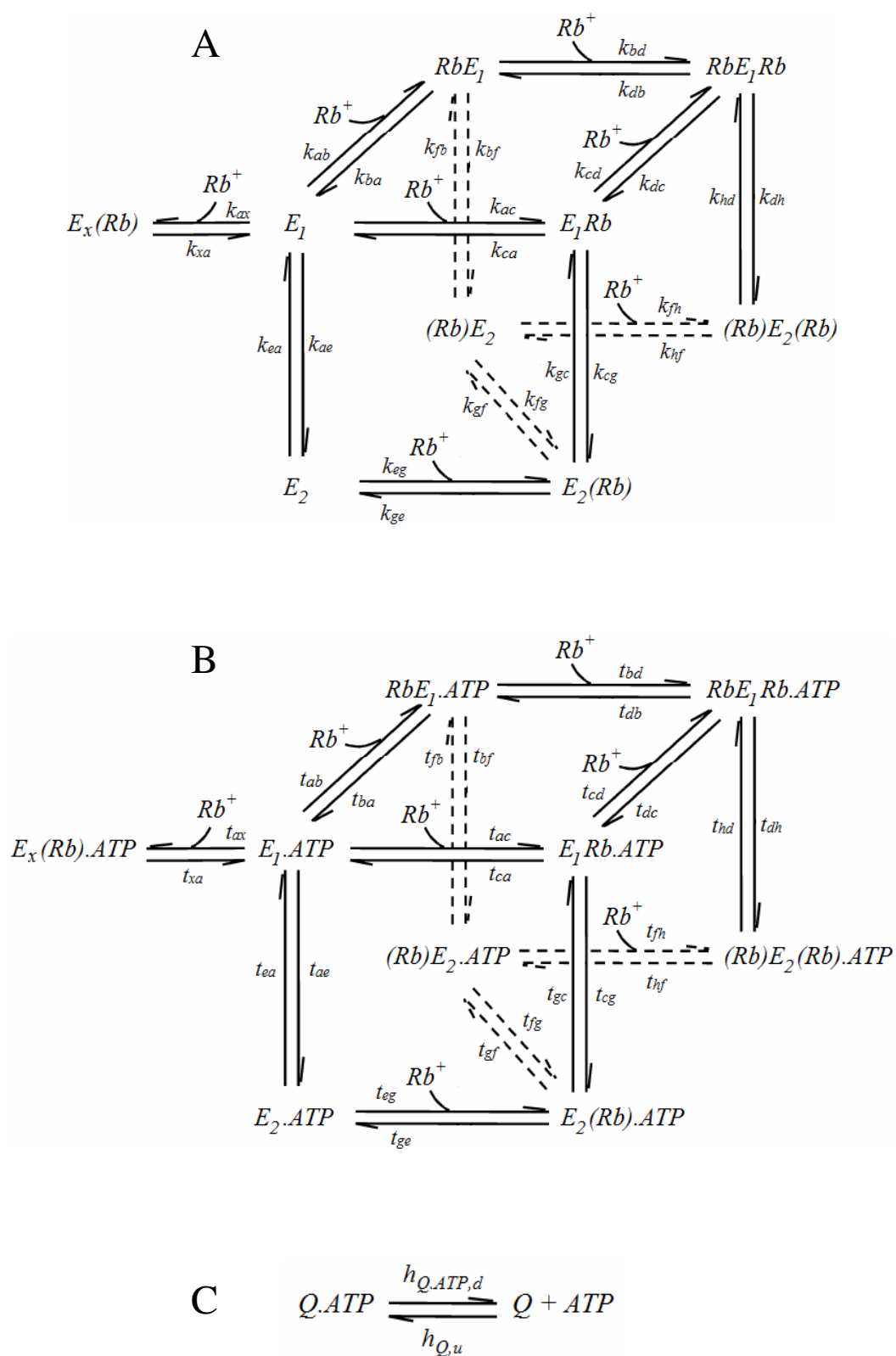


Figura VII-2

La especie  $E_x(\text{Rb})$  fue incorporada para lograr reproducir la fase de oclusión muy rápida y de pequeña amplitud observada cuando se estudia el incremento en el tiempo de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido por la ruta directa. La dependencia hiperbólica de la amplitud de esta fase respecto de la concentración de  $\text{Rb}^+$ , tanto en presencia como en ausencia de ATP, permitía suponer que estaba implicada la oclusión de un solo  $\text{Rb}^+$ . La localización del ion ocluido a la derecha de  $E_x$  es arbitraria. De hecho, podría estar implicado un sitio distinto de los sitios habituales de oclusión. Además, se supuso que  $E_x(\text{Rb})$  se forma a partir de la especie  $E_1$  porque, como se mencionó en el Capítulo IV, esa fase muy rápida también puede ser observada al estudiar la oclusión a través de las modificaciones en la intensidad de fluorescencia de la sonda extrínseca eosina-Y unida no covalentemente a la enzima (Montes *et al.*, 2006). La fluorescencia de esta sonda es máxima cuando está unida a intermediarios en conformación  $E_1$ , y su afinidad por éstos es mucho mayor que por aquéllos con  $\text{Rb}^+$  ocluido ( $E_2$ ). Cuando tiene lugar la oclusión de  $\text{Rb}^+$ , se observa una disminución de la fluorescencia emitida debido a la disociación de la sonda y a la menor fluorescencia de la sonda que permanece unida. Teniendo esto en cuenta, podemos suponer que la fase muy rápida de oclusión, evidenciada en el trabajo de Montes *et al.* por una rápida disminución de la fluorescencia, debe involucrar la unión de  $\text{Rb}^+$  a alguna especie que se encontraba en la conformación  $E_1$ . Cabe aclarar aquí que ninguna otra secuencia de reacciones del modelo (por ejemplo:  $E_1 + \text{Rb}^+ \rightarrow E_1\text{Rb} \rightarrow E_2(\text{Rb})$ ) lograba reproducir la fase en cuestión. Por otro lado, dado que en presencia de ATP la amplitud de esta fase decrece pero no desaparece, concluimos que también debe ser posible que se forme  $E_x(\text{Rb}).\text{ATP}$  a partir de  $E_1.\text{ATP}$ .

Sólo las formas  $E_2$  y  $E_x$  pueden ocluir  $\text{Rb}^+$ , ya sea que estén o no unidas a ATP. De esta manera, la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido será proporcional a la suma:

$$[E_2(\text{Rb})] + [(Rb)E_2] + 2[(Rb)E_2(Rb)] + [E_x(\text{Rb})] + [E_2(\text{Rb}).\text{ATP}] + [(Rb)E_2.\text{ATP}] + 2[(Rb)E_2(Rb).\text{ATP}] + [E_x(\text{Rb}).\text{ATP}]$$

#### Ecuación VII-1

El modelo fue ajustado *al conjunto* de resultados discutidos en esta tesis con el fin de hallar los valores de las constantes de velocidad que permitían obtener la mayor

similitud entre el comportamiento predicho por el modelo y las observaciones empíricas. Debido a la complejidad del modelo analizado, la relación *predicha* entre la concentración de cada una de las especies y el tiempo de incubación, para cada condición experimental, no pudo ser obtenida mediante la resolución analítica del sistema de ecuaciones diferenciales que se deduce de las reacciones. En cambio, dicho sistema de ecuaciones fue resuelto mediante métodos numéricos, que permiten calcular la concentración de cada especie como función del tiempo sin necesidad de contar de manera explícita con la función que la define. Como se detalla en Materiales y Métodos, tanto la resolución numérica como el ajuste del modelo fueron llevados a cabo con el programa de acceso libre COPASI (Hoops *et al.*, 2006).

Antes de proceder con el ajuste, y con el objeto de reducir la variación entre experimentos y hacer comparables resultados obtenidos en diferentes días y con diferentes protocolos experimentales, se procedió a normalizar los resultados de la manera que se describe en Materiales y Métodos (para las medidas de  $\text{Rb}_{\text{ocI}}$  en el equilibrio) o en el anexo a este capítulo. Por otro lado, el estudio de la distribución de los errores aleatorios de las medidas mostró la necesidad de asignar a las diferentes medidas distintos pesos estadísticos para poder realizar un correcto análisis por regresión. El procedimiento empleado para el cálculo de los pesos estadísticos también se describe en el anexo.

En el proceso de ajuste se impusieron las siguientes restricciones a los valores de las constantes de velocidad del modelo:

1) Restricciones de carácter termodinámico, debido a la existencia de múltiples caminos que vinculan el mismo par de especies y que deben estar asociados a un cambio de energía libre idéntico:

$$k_{fg} = \frac{k_{gf} \cdot k_{fb} \cdot k_{ba} \cdot k_{ac} \cdot k_{cg}}{k_{gc} \cdot k_{ca} \cdot k_{ab} \cdot k_{bf}}$$

$$k_{gc} = \frac{k_{cg} \cdot k_{ge} \cdot k_{ea} \cdot k_{ac}}{k_{ca} \cdot k_{ae} \cdot k_{eg}}$$

$$k_{hd} = \frac{k_{dh} \cdot k_{hf} \cdot k_{fb} \cdot k_{bd}}{k_{db} \cdot k_{bf} \cdot k_{fh}}$$



$$\begin{aligned}
t_{ea} &= \frac{t_{ae} \cdot h_{E_2, \text{ATP}, d} \cdot k_{ea} \cdot h_{E_1, u}}{h_{E_1, \text{ATP}, d} \cdot k_{ae} \cdot h_{E_2, u}} \\
t_{fg} &= \frac{t_{gf} \cdot t_{fb} \cdot t_{ba} \cdot t_{ac} \cdot t_{cg}}{t_{gc} \cdot t_{ca} \cdot t_{ab} \cdot t_{bf}} \\
t_{gc} &= \frac{t_{cg} \cdot t_{ge} \cdot t_{ea} \cdot t_{ac}}{t_{ca} \cdot t_{ae} \cdot t_{eg}} \\
t_{hd} &= \frac{t_{dh} \cdot t_{hf} \cdot t_{fb} \cdot t_{bd}}{t_{db} \cdot t_{bf} \cdot t_{fh}} \\
h_{\text{Rb}E_1, \text{ATP}, d} &= \frac{h_{\text{Rb}E_1, u} \cdot t_{ba} \cdot h_{E_1, \text{ATP}, d} \cdot k_{ab}}{k_{ba} \cdot h_{E_1, u} \cdot t_{ab}} \\
h_{E_1 \text{Rb}, \text{ATP}, d} &= \frac{h_{E_1 \text{Rb}, u} \cdot t_{ca} \cdot h_{E_1, \text{ATP}, d} \cdot k_{ac}}{k_{ca} \cdot h_{E_1, u} \cdot t_{ac}} \\
h_{\text{Rb}E_1 \text{Rb}, \text{ATP}, d} &= \frac{h_{\text{Rb}E_1 \text{Rb}, u} \cdot t_{db} \cdot h_{\text{Rb}E_1, \text{ATP}, d} \cdot k_{bd}}{k_{db} \cdot h_{\text{Rb}E_1, u} \cdot t_{bd}} \\
h_{E_2, \text{ATP}, d} &= \frac{h_{E_2, u} \cdot t_{eg} \cdot h_{E_2(\text{Rb}), \text{ATP}, d} \cdot k_{ge}}{k_{eg} \cdot h_{E_2(\text{Rb}), u} \cdot t_{ge}} \\
h_{(\text{Rb})E_2, \text{ATP}, d} &= \frac{h_{(\text{Rb})E_2, u} \cdot t_{fg} \cdot h_{E_2(\text{Rb}), \text{ATP}, d} \cdot k_{gf}}{k_{fg} \cdot h_{E_2(\text{Rb}), u} \cdot t_{gf}} \\
h_{(\text{Rb})E_2(\text{Rb}), \text{ATP}, d} &= \frac{h_{(\text{Rb})E_2(\text{Rb}), u} \cdot t_{hf} \cdot h_{(\text{Rb})E_2, \text{ATP}, d} \cdot k_{fh}}{k_{hf} \cdot h_{(\text{Rb})E_2, u} \cdot t_{fh}} \\
h_{E_x(\text{Rb}), \text{ATP}, d} &= \frac{h_{E_x(\text{Rb}), u} \cdot t_{xa} \cdot h_{E_1, \text{ATP}, d} \cdot k_{ax}}{k_{xa} \cdot h_{E_1, u} \cdot t_{ax}}
\end{aligned}$$

2) Se supuso que la unión de  $\text{Rb}^+$  a las especies en conformación  $E_1$  se encontraba en equilibrio rápido, ya sea que éstas estuvieran o no unidas a ATP, y que en todos los casos la constante de equilibrio de disociación del  $\text{Rb}^+$  (que llamamos  $K_{\text{Rb}}$ ) era la misma. Eso se traduce en la equivalencia:

$$K_{\text{Rb}} = \frac{k_{ba}}{k_{ab}} = \frac{k_{ca}}{k_{ac}} = \frac{k_{db}}{k_{bd}} = \frac{k_{dc}}{k_{cd}} = \frac{t_{ba}}{t_{ab}} = \frac{t_{ca}}{t_{ac}} = \frac{t_{db}}{t_{bd}} = \frac{t_{dc}}{t_{cd}}$$

Esto simplificó la resolución de las ecuaciones y redujo la cantidad de parámetros libres, reduciendo el tiempo de cálculo, pero sólo permite obtener un valor para  $K_{\text{Rb}}$  y no para cada constante de velocidad individual.

3) Para que se verifique una dependencia hiperbólica entre  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el equilibrio y la concentración de  $\text{Rb}^+$  en ausencia de ATP, debía cumplirse que los cocientes  $k_{ge} / k_{eg}$  y  $k_{hf} / k_{fh}$  fuesen iguales, y que  $k_{gf} / k_{fg}$  fuese igual a uno (ver Capítulo III, Esquema III-3 y discusión asociada). Se planteó entonces que:

$$k_{fh} = k_{eg}$$

$$k_{hf} = k_{ge}$$

$$k_{fg} = k_{gf}$$

4) Se supuso que la presencia de ATP no modifica los valores de las constantes de velocidad ni de la constante de equilibrio de la reacción que vincula las especies  $E_2(\text{Rb})$  y  $(\text{Rb})E_2$ , por lo que:

$$t_{gf} = k_{gf}$$

$$t_{gf} = t_{fg}$$

5) Se supuso que la probabilidad de que ocurra la oclusión en especies con un solo  $\text{Rb}^+$  unido no depende de la posición que ocupa ese ion. Así:

$$k_{cg} = k_{bf}$$

$$t_{cg} = t_{bf}$$

6) Se supuso que la constante de velocidad que gobierna la unión de ATP a cierta especie era la misma independientemente de la especie considerada, y se la denominó de manera general  $h_u$ :

$$h_u = h_{E_1,u} = h_{\text{Rb}E_1,u} = h_{E_1\text{Rb},u} = h_{\text{Rb}E_1\text{Rb},u} = h_{E_2,u} = h_{E_2(\text{Rb}),u} = h_{(\text{Rb})E_2,u} = h_{(\text{Rb})E_2(\text{Rb}),u} = h_{E_x(\text{Rb}),u}$$

El ajuste del modelo dio como resultado los valores de las constantes que se informan en la Tabla VII-1 junto a una estimación de su error estándar.

**Tabla VII-1.** Valores de los parámetros del modelo de la Figura VII-2 que resultaron de su ajuste al conjunto de resultados experimentales.

Parámetro	Valor $\pm$ E.S.	Unidades
$k_{ae}$	$64 \pm 12$	$\text{s}^{-1}$
$k_{ea}$	$17,6 \pm 1,8$	$\text{s}^{-1}$
$K_{\text{Rb}}$	$(3,79 \pm 0,34) \cdot 10^3$	$\mu\text{M}$
$k_{bf} = k_{cg}$	$276 \pm 32$	$\text{s}^{-1}$
$k_{fb} = k_{gc}^{(1,2)}$	$0,101 \pm 0,026$	$\text{s}^{-1}$
$k_{dh}$	$(4,73 \pm 0,96) \cdot 10^3$	$\text{s}^{-1}$
$k_{hd}^{(2)}$	$0,00231 \pm 0,00084$	$\text{s}^{-1}$
$k_{eg} = k_{fh}$	$0,01664 \pm 0,00049$	$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
$k_{ge} = k_{hf}$	$0,0839 \pm 0,0023$	$\text{s}^{-1}$
$k_{gf} = k_{fg} = t_{gf} = t_{fg}$	$0,0269 \pm 0,0070$	$\text{s}^{-1}$
$k_{ax}$	$11 \pm 65$	$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
$k_{xa}$	$(0,5 \pm 3,2) \cdot 10^4$	$\text{s}^{-1}$
$t_{ae}$	$5,0 \pm 1,6$	$\text{s}^{-1}$
$t_{ea}^{(2)}$	$69 \pm 39$	$\text{s}^{-1}$
$t_{bf} = t_{cg}$	$3,54 \pm 0,89$	$\text{s}^{-1}$
$t_{fb} = t_{gc}^{(1,2)}$	$0,46 \pm 0,34$	$\text{s}^{-1}$
$t_{dh}$	$(9,4 \pm 1,5) \cdot 10^2$	$\text{s}^{-1}$
$t_{hd}^{(2)}$	$2,1 \pm 7,9$	$\text{s}^{-1}$
$t_{eg}$	$0,071 \pm 0,010$	$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
$t_{ge}$	$2,53 \pm 0,41$	$\text{s}^{-1}$
$t_{fh}$	$(0,7 \pm 1,7) \cdot 10^3$	$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
$t_{hf}$	$0,04 \pm 0,11$	$\text{s}^{-1}$
$t_{ax}$	$0,051 \pm 0,066$	$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
$t_{xa}$	$379 \pm 511$	$\text{s}^{-1}$

**Tabla VII-1 (Continuación).** Valores de los parámetros del modelo de la Figura VII-2 que resultaron de su ajuste al conjunto de resultados experimentales.

Parámetro	Valor $\pm$ E.S.	Unidades
$h_u$	$15,3 \pm 3,6$	$\text{s}^{-1} \mu\text{M}^{-1}$
$h_{E_1.ATP,d} = h_{RbE_1.ATP,d} =$ $h_{E_1Rb.ATP,d} = h_{RbE_1Rb.ATP,d}^{(1)}$	$3,00 \pm 0,70$	$\text{s}^{-1}$
$h_{E_2.ATP,d}^{(2)}$	$151 \pm 56$	$\text{s}^{-1}$
$h_{E_2(Rb).ATP,d} = h_{(Rb)E_2.ATP,d}^{(1)}$	$(10,6 \pm 2,7) \cdot 10^2$	$\text{s}^{-1}$
$h_{(Rb)E_2(Rb).ATP,d}^{(2)}$	$(1,4 \pm 5,0) \cdot 10^4$	$\text{s}^{-1}$
$h_{E_x(Rb).ATP,d}^{(2)}$	$(0,4 \pm 4,0) \cdot 10^2$	$\text{s}^{-1}$
$E_T$	$2,7788 \pm 0,0065$	$\text{nmol} \cdot (\text{mg prot})^{-1}$

<sup>(1)</sup> Equivalencias que surgen como consecuencia de las restricciones enumeradas anteriormente.

<sup>(2)</sup> Parámetros que, por estar definidos por otros parámetros de acuerdo con las restricciones mencionadas, no fueron ajustados y su error estándar fue propagado a partir del error estándar de aquéllos.

## ***Análisis de los parámetros surgidos del ajuste del modelo***

### ***Constante de disociación del $\text{Rb}^+$ de los sitios expuestos por el conformero $E_1$***

$K_{Rb}$ , la constante de equilibrio de disociación del  $\text{Rb}^+$  de los sitios de unión en el conformero  $E_1$  de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, tomó un valor cercano a 3,8 mM. Este valor es muy similar al obtenido por González-Lebrero *et al.* (2002a) al ajustar el modelo de la Figura VII-1 a curvas de oclusión, desocclusión y  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el equilibrio en ausencia de ATP (3,0 mM, calculado como el cociente entre las constantes  $k_{-a1}$  y  $k_{a1}$ ), pero inferior al estimado por Shani-Sekler *et al.* (1988) a través de medidas de fluorescencia empleando  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa marcada con isotiocianato de fluoresceína (15 - 20 mM).

### **Constante de disociación de los complejos formados por el ATP y la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa**

La constante de equilibrio de disociación del ATP de cualquiera de las especies en conformación  $E_1$  resultó igual a  $0,20 \mu\text{M}$  (cociente  $h_{E_1.ATP,d} / h_u$ ). Esta constante fue estimada en numerosas oportunidades a partir de estudios de la unión de ATP a  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa proveniente de diferentes tejidos, en medios de reacción libres de  $\text{K}^+$ . Nørby y Jensen (1971), trabajando con microsomas de cerebro, y Hegyvary y Post (1971), con microsomas de corteza renal, obtuvieron valores de  $0,12 \mu\text{M}$  y  $0,22 \mu\text{M}$ , respectivamente. Luego, Jørgensen (1977) estimó esta constante en  $0,09 \mu\text{M}$ , empleando enzima proveniente de médula externa renal. Aunque estos estudios fueron llevados a cabo a temperaturas cercanas a  $0^\circ\text{C}$  para minimizar la hidrólisis de ATP, los valores mencionados coinciden con el estimado a temperatura ambiente por Karlisch *et al.* (1978a), quienes obtuvieron un valor de  $0,15 \mu\text{M}$  al estudiar la competencia entre el ATP y trifosfato de formicina (un análogo fluorescente del ATP) por la unión a la isoforma renal de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa.

Como se esperaba, la constante de equilibrio de disociación del ATP de las formas en conformación  $E_2$  es mayor que la recién mencionada, y se incrementa al aumentar la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido tomando valores de 9,9; 69 y  $915 \mu\text{M}$  para los complejos  $E_2.ATP$ ,  $E_2(\text{Rb}).ATP$  [y  $(\text{Rb})E_2.ATP$ ] y  $(\text{Rb})E_2(\text{Rb}).ATP$ . Estos últimos dos valores son similares a los estimados en el Capítulo III a partir de medidas de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en el equilibrio ( $72,9$  y  $1680 \mu\text{M}$ , ver  $K'_{ATP}$  y  $K''_{ATP}$  en la Tabla III-4). El elevado error estándar de la constante de velocidad de disociación del nucleótido de  $(\text{Rb})E_2(\text{Rb})$  ( $h_{(\text{Rb})E_2(\text{Rb}).ATP,d}$ ) podría reflejar que la interacción del ATP con dicha especie se encuentra en equilibrio rápido (como proponen Kaufman *et al.*, 1999), y por ser un proceso mucho más rápido que los tiempos de incubación empleados en los experimentos, las medidas realizadas no permiten estimar correctamente su valor.

En el Capítulo III se mostró que a partir de medidas de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el equilibrio era posible estimar la constante *aparente* de disociación del ATP de la enzima en medios de reacción sin  $\text{Rb}^+$ , y se obtuvo un valor de  $0,89 \mu\text{M}$  (ver  $K_{ATP}$  en la Tabla III-4). Este valor no coincide con las constantes de disociación de los complejos  $E_1.ATP$  ( $0,20 \mu\text{M}$ ) o  $E_2.ATP$  ( $9,9 \mu\text{M}$ ). Esto responde a que, en ausencia de  $\text{Rb}^+$ , coexisten en el equilibrio las especies  $E_1$ ,  $E_2$ ,  $E_1.ATP$  y  $E_2.ATP$ . El valor de la constante aparente de disociación

del ATP de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa informado en el Capítulo III ( $K_{ATP}$ ) es una combinación lineal de las constantes de disociación de los complejos con  $E_1$  y  $E_2$ . Puede demostrarse que  $K_{ATP}$  debería tomar un valor igual a  $f_{E_1.ATP} \cdot 0,20 \mu\text{M} + f_{E_2.ATP} \cdot 9,9 \mu\text{M}$ , donde  $f_{E_1.ATP}$  y  $f_{E_2.ATP}$  representan la fracción de la enzima unida a ATP que se encuentra como  $E_1.ATP$  y  $E_2.ATP$ , respectivamente. Del cociente  $t_{ea} / t_{ae}$  se deduce que aproximadamente el 93% de la enzima unida a ATP se encuentra como  $E_1.ATP$ , por lo que el resultado de la fórmula anterior es  $0,88 \mu\text{M}$ , muy cercano al valor informado para  $K_{ATP}$  en el Capítulo III.

### ***Velocidad del cambio conformacional entre las especies $E_1\text{Rb}_n$ y $E_2(\text{Rb})_n$***

Los valores obtenidos para las constantes de velocidad que caracterizan la transición entre  $E_1$  y  $E_2$  en ausencia de  $\text{Rb}^+$  ( $k_{ae}$  y  $k_{ea}$ , o  $t_{ae}$  y  $t_{ea}$ , según las especies estén libres o unidas a ATP) son compatibles con los esperados para constantes asociadas a cambios conformacionales en una proteína ( $< 10^4 \text{ s}^{-1}$ ; Hammes y Schimmel, 1970), y permiten calcular que, en el equilibrio,  $E_1$  representará el 22 % de la enzima total en medios de reacción libres de ATP, o el 93 % (como  $E_1.ATP$ ) cuando la concentración de ATP tienda a infinito.

Al comparar estos resultados con los informados en la bibliografía pudimos comprobar que el valor de  $k_{ea}$ , así como la distribución entre  $E_1$  y  $E_2$  en el equilibrio en ausencia de  $\text{Rb}^+$  y de ATP, no coinciden con resultados de Montes *et al.* (2012). En ese trabajo, estudiando los cambios en la fluorescencia de la sonda eosina-Y (asociados a cambios en la concentración de  $E_1$ ), se estimó la constante de la transición  $E_2 \rightarrow E_1$  en aproximadamente  $0,13 \text{ s}^{-1}$ , y que más del 70 % de la enzima se encuentra en conformación  $E_1$  en ausencia de ligandos y en un medio de reacción conteniendo 25 mM imidazol.HCl pH 7,4 a 25 °C (idéntico al medio de reacción empleado en nuestros experimentos). No contamos con una explicación para esta discordancia.

La transición de las formas  $E_1$  con  $\text{Rb}^+$  unido a  $E_2$  con  $\text{Rb}^+$  ocluido se encuentra más favorecida cuanto mayor es la cantidad de  $\text{Rb}^+$  unido, tanto en ausencia como en presencia de ATP. En este último caso, sin embargo, las constantes de velocidad del cambio conformacional son menores, siendo esto más marcado para la especie con un solo  $\text{Rb}^+$  unido (comparar  $k_{bf}$  y  $k_{dh}$  con  $t_{bf}$  y  $t_{dh}$ ). Es interesante notar, por otro lado, que

el valor obtenido para  $k_{bf}$  y  $t_{bf}$  ( $276 \pm 32 \text{ s}^{-1}$  y  $3,54 \pm 0,89 \text{ s}^{-1}$ ) es muy similar al informado en el Capítulo IV (sección IV), cuando se realizó una estimación de las constantes de velocidad de las reacciones  $E_1\text{Rb} \rightarrow E_2(\text{Rb})$  ( $134 \text{ s}^{-1}$ ) y  $\text{ATP}.E_1\text{Rb} \rightarrow \text{ATP}.E_2(\text{Rb})$  ( $3,0 \text{ s}^{-1}$ ) a partir del análisis de medidas de  $v_{ocl}$  empleando los modelos presentados en los Esquemas IV-1 y IV-2, respectivamente.

Las constantes que gobiernan las reacciones inversas, es decir, la desoclusión de  $\text{Rb}^+$  mediante el cambio conformacional  $E_2 \rightarrow E_1$ , son mayores en presencia de ATP. Esto condice con la aceleración de la desoclusión inducida por el nucleótido. En ausencia de ATP, la desaparición de la especie con dos iones  $\text{Rb}^+$  ocluidos por transición a la conformación  $E_1$  es marcadamente menos probable que la de aquéllas con sólo uno. Considerando el valor obtenido para la constante  $k_{hd}$  ( $0,00231 \pm 0,00084 \text{ s}^{-1}$ ), la transición  $(\text{Rb})E_2(\text{Rb}) \rightarrow \text{Rb}E_1\text{Rb}$  sería la responsable de la lenta desoclusión de  $\text{Rb}^+$  que tiene lugar cuando la concentración del catión en el medio de incubación tiende a infinito (cuyo coeficiente de velocidad fue estimado en  $0,00278 \pm 0,00028 \text{ s}^{-1}$ ).

Es importante destacar que las reacciones que vinculan las especies en conformación  $E_1$  con  $\text{Rb}^+$  unido con aquéllas en conformación  $E_2$  con  $\text{Rb}^+$  ocluido están suficientemente desplazadas para hacer que, en el equilibrio, la concentración de las primeras sea despreciable, independientemente de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  unido y de la presencia de ATP en el medio de reacción. Esto concuerda con el análisis de las medidas mostradas en el Capítulo III, que permitía concluir que todo el  $\text{Rb}^+$  unido en el equilibrio debía estar también ocluido.

### ***Capacidad del modelo ajustado para reproducir los resultados experimentales***

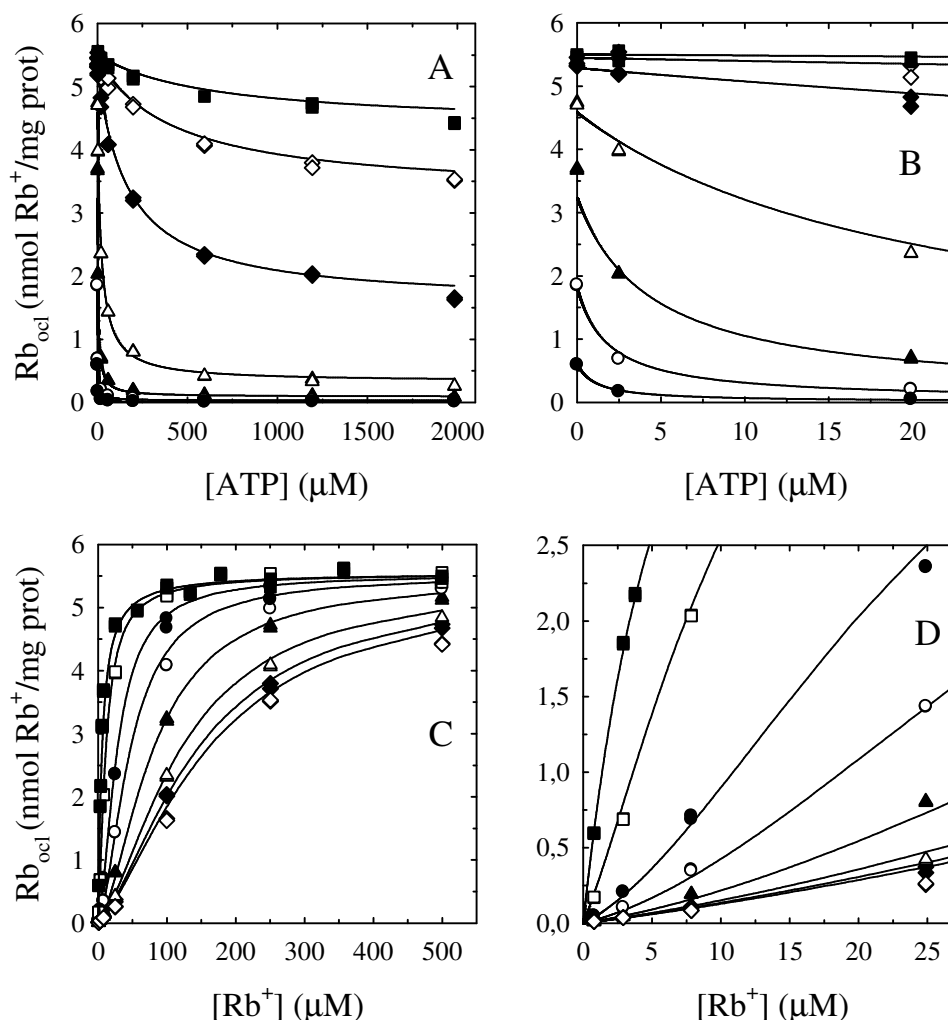
En los apartados que siguen se grafican los resultados presentados en los Capítulos III, IV y V (normalizados como se explica en Materiales y Métodos o en el anexo a este capítulo), junto con las predicciones que de ellos proporciona el modelo de la Figura VII-2, luego de asignar a cada parámetro el valor ajustado informado en la Tabla VII-1. Con el fin de realizar además una comparación cuantitativa, y poner en evidencia sesgos del ajuste que son difíciles de percibir mediante la sola comparación visual de la información empírica y la correspondiente predicción, se evaluó si era posible obtener

valores de parámetros similares al ajustar la misma ecuación empírica a los resultados experimentales y a valores de  $\text{Rb}_{\text{ocI}}$  simulados para exactamente las mismas condiciones (tiempos de incubación y concentraciones de reactivos). Para ello, se procedió de la siguiente manera. Se calcularon con el modelo valores de  $\text{Rb}_{\text{ocI}}$  que correspondían al mismo tiempo de incubación y concentraciones de  $\text{Rb}^+$ , ATP y enzima que los empleados para obtener las medidas experimentales, de forma que la información asociada a los resultados experimentales y simulados fuese comparable en cuanto a niveles de variables y número de datos. Luego, se ajustó tanto a las medidas experimentales como a las simuladas la misma ecuación empírica que había sido empleada al analizar los resultados experimentales en el correspondiente capítulo de “Resultados”. Finalmente, los valores de los parámetros obtenidos del ajuste de ambas series de resultados (experimentales y simulados) fueron comparados en un mismo gráfico. Estos gráficos también se presentan a continuación. Debemos aclarar que, en el caso de los valores simulados, no se estimó el error estándar asociado a cada parámetro por tratarse de un ajuste a resultados que carecen de error experimental.



### *Efectos del $\text{Rb}^+$ y del ATP sobre la cantidad de $\text{Rb}^+$ ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico (Capítulo III)*

En la Figura VII-3 se reproducen, con símbolos, las medidas de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el equilibrio presentadas en la Figura III-1, y con líneas de trazo continuo las correspondientes predicciones del modelo de la Figura VII-2.

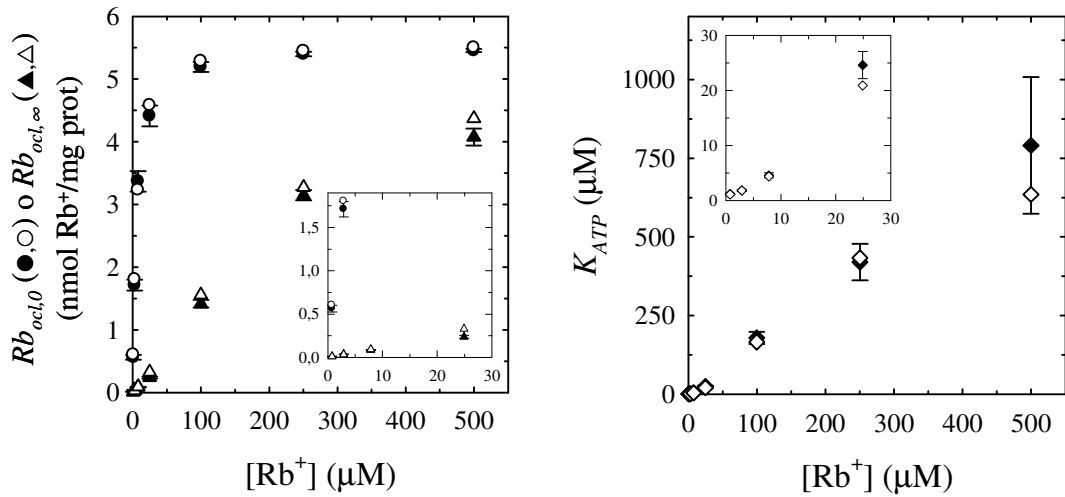


**Figura VII-3.** Resultados experimentales y simulación de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en el equilibrio en función de la concentración de ATP (A y B) o de  $\text{Rb}^+$  (C y D) presente en el medio de reacción. Los símbolos reproducen los resultados experimentales mostrados en la Figura III-1, obtenidos en medios de reacción que contenían la concentración de ATP o  $\text{Rb}^+$  indicada en abscisas y 0,78 (●); 2,9 (○); 7,9 (▲); 25 (△); 100 (◆); 250 (◇) o 500 (■)  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$  (A y B) o 0 (■); 2,49 (□); 19,9 (●); 59,5 (○); 199 (▲); 595 (△); 1194 (◆) o 1984 (◇)  $\mu\text{M}$  ATP (C y D). Las líneas de trazo continuo representan las predicciones del modelo de la Figura VII-2 luego de asignar a sus parámetros los valores informados en la Tabla VII-1.

Puede verse que las predicciones concuerdan muy bien con los resultados experimentales. La Ecuación VII-2, que es idéntica a la III-1, fue empleada para ajustar los resultados simulados de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  correspondientes a las mismas concentraciones de  $\text{Rb}^+$  y de ATP utilizadas para obtener los resultados experimentales del Panel A:

$$\text{Rb}_{\text{ocl}} = \frac{\text{Rb}_{\text{ocl},0} K_{\text{ATP}} + \text{Rb}_{\text{ocl},\infty} [\text{ATP}]}{K_{\text{ATP}} + [\text{ATP}]} \quad \text{Ecuación VII-2}$$

Los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl},0}$ ,  $\text{Rb}_{\text{ocl},\infty}$  y  $K_{\text{ATP}}$  que proporcionaron el mejor ajuste se grafican con símbolos vacíos en la Figura VII-4 como función de la concentración de  $\text{Rb}^+$ . Para su comparación, los gráficos incluyen los valores de dichos parámetros obtenidos al ajustar la Ecuación VII-2 a los resultados experimentales (símbolos llenos).



**Figura VII-4.** Valores de los parámetros  $\text{Rb}_{\text{ocl},0}$  (● y ○),  $\text{Rb}_{\text{ocl},\infty}$  (▲ y △) y  $K_{\text{ATP}}$  (◆ y ◇) de la Ecuación VII-2 que brindaron el mejor ajuste a los resultados experimentales (símbolos llenos) o simulados (símbolos vacíos) de los Paneles A y B de la Figura VII-3. Los valores representados por símbolos llenos corresponden a aquéllos que habían sido informados en los Paneles A y B de la Figura III-2. Los gráficos insertos detallan los valores obtenidos para las menores concentraciones de  $\text{Rb}^+$ . Las barras de error representan  $\pm 1$  error estándar estimado.

El análisis de la figura permite concluir que no existen diferencias marcadas entre los parámetros obtenidos por ajuste de la Ecuación VII-2 a los resultados experimentales o simulados. El modelo, por lo tanto, explica adecuadamente las modificaciones en los

valores de  $Rb_{ocl}$  en el equilibrio observadas en nuestros experimentos frente a modificaciones en las concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP.

### ***Efectos del $Rb^+$ y del ATP sobre la cinética de oclusión de $Rb^+$ (Capítulo IV)***

Se generaron valores de  $Rb_{ocl}$  que describieran la cinética de oclusión de  $Rb^+$  predicha por el modelo de la Figura VII-2, en las mismas condiciones que las empleadas para obtener los resultados experimentales de las Figuras IV-1, IV-3 y IV-5.

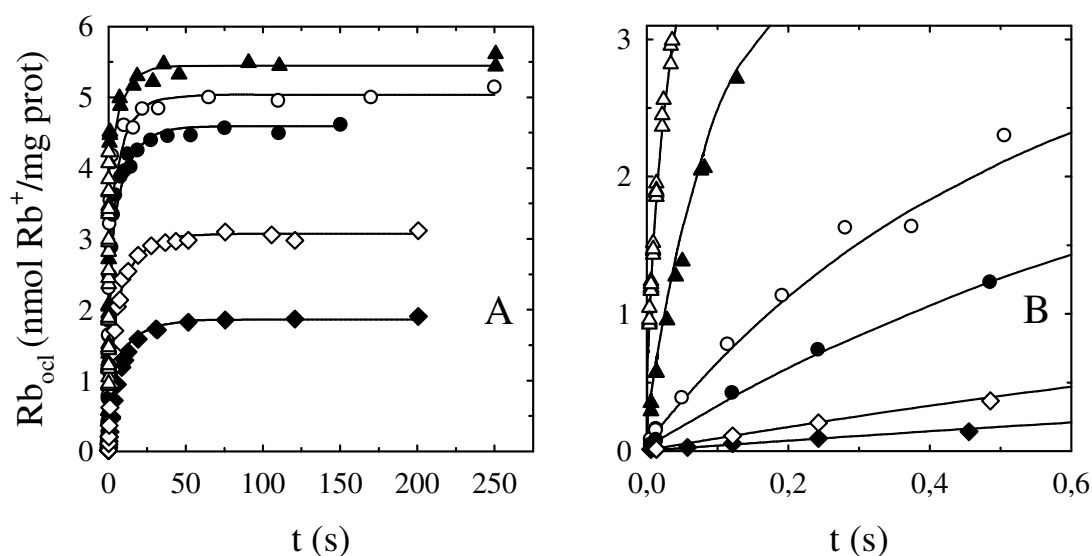
#### ***Cinética de oclusión de $Rb^+$ en ausencia de ATP (sección I)***

La Figura VII-5 muestra los resultados experimentales informados en la Figura IV-1, normalizados como se explica en el anexo, y la correspondiente predicción obtenida a partir del modelo de la Figura VII-2.

La Ecuación VII-3, que es idéntica a la IV-1, fue ajustada tanto a los resultados experimentales como a aquéllos simulados para los mismos tiempos de incubación y concentración de  $Rb^+$ . Para proceder de la misma manera que cuando se analizaron los resultados en el Capítulo IV, se omitió el último término exponencial en la ecuación ajustada a las medidas correspondientes a 900  $\mu M$   $Rb^+$  (Ecuación VII-4, idéntica a la IV-2).

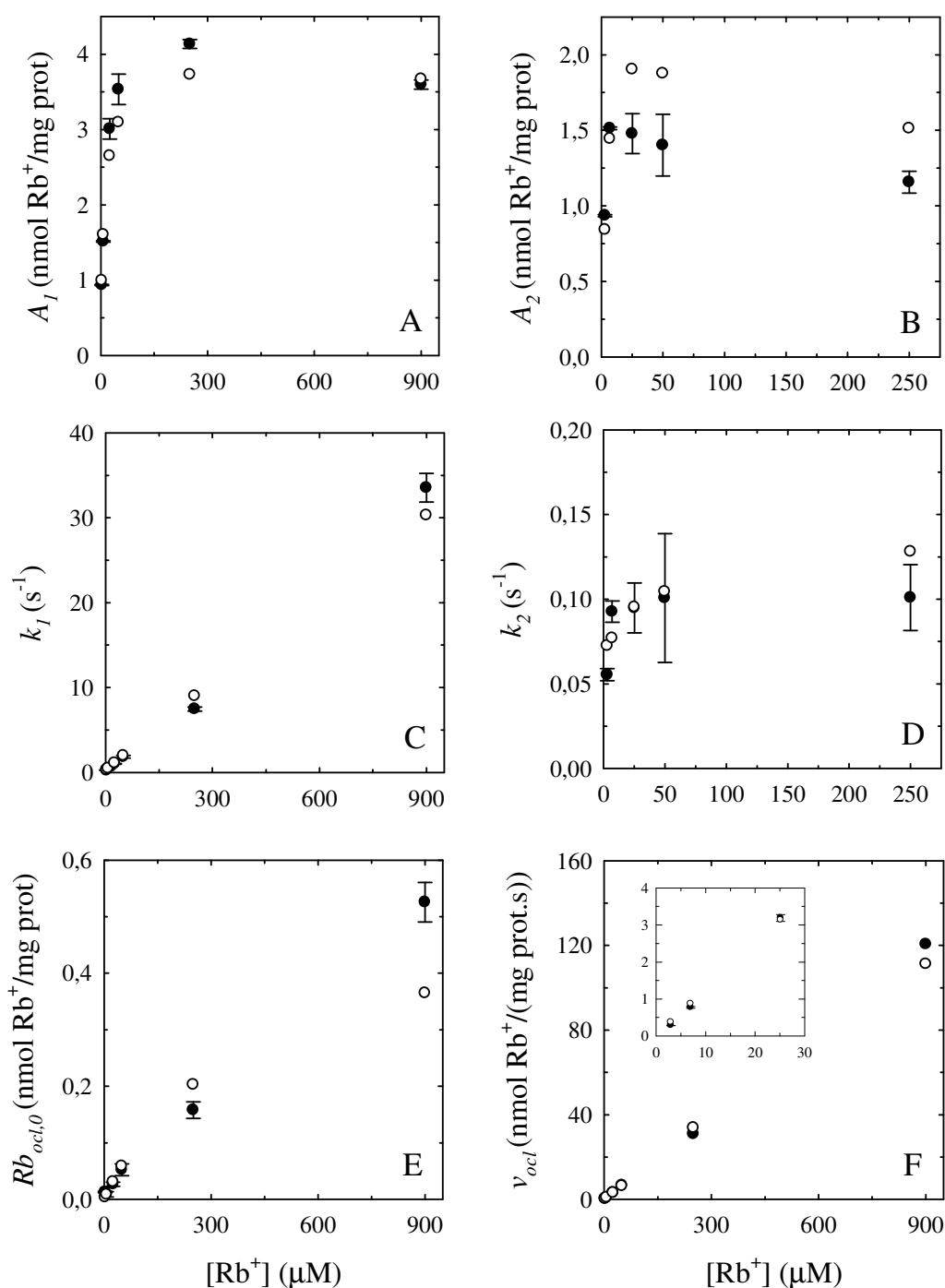
$$Rb_{ocl} = Rb_{ocl,0} + A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{Ecuación VII-3}$$

$$Rb_{ocl} = Rb_{ocl,0} + A_1(1 - e^{-k_1 t}) \quad \text{Ecuación VII-4}$$



**Figura VII-5.** Resultados experimentales y simulación de  $\text{Rb}_{\text{oci}}$  como función del tiempo, en medios de reacción sin ATP. Los símbolos reproducen los resultados experimentales mostrados en la Figura IV-1 luego de ser normalizados como se explica en el anexo, obtenidos empleando las siguientes concentraciones de  $\text{Rb}^+$ : 3 ( $\blacklozenge$ ), 7 ( $\diamond$ ), 25 ( $\bullet$ ), 50 ( $\circ$ ), 250 ( $\blacktriangle$ ) y 900 ( $\triangle$ )  $\mu\text{M}$ . Los resultados correspondientes a 900  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$  sólo se extienden hasta un tiempo de incubación de 0,129 segundos, por lo que es difícil apreciarlos en el Panel A. Las líneas de trazo continuo representan las predicciones del modelo de la Figura VII-2 luego de asignar a sus parámetros los valores informados en la Tabla VII-1. El Panel B es un detalle de los valores de  $\text{Rb}_{\text{oci}}$  correspondientes a tiempos de incubación menores que 0,6 segundos.

Los valores de los parámetros obtenidos del ajuste de las Ecuaciones VII-3 y VII-4 se grafican en la Figura VII-6 como función de la concentración de  $\text{Rb}^+$ , correspondiendo los símbolos vacíos al ajuste a los resultados simulados, y los símbolos llenos al ajuste a los resultados experimentales. También se informa el valor calculado de la velocidad inicial de oclusión ( $v_{\text{oci}}$ , Panel F).



**Figura VII-6.** Paneles A - E: Dependencia respecto de la concentración de  $\text{Rb}^+$  de los parámetros de las Ecuaciones VII-3 y VII-4 (sólo para 900  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$ ) que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados experimentales (símbolos llenos) o simulados (símbolos vacíos) de la Figura VII-5. Dado que la Ecuación VII-4 no contiene los parámetros  $A_2$  y  $k_2$ , sólo  $\text{Rb}_{ocl,0}$ ,  $A_1$  y  $k_1$  presentan valores para 900  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$ . Panel F: Velocidad inicial de oclusión, calculada como  $A_1 \cdot k_1 + A_2 \cdot k_2$ . Las barras verticales indican  $\pm 1$  error estándar estimado.

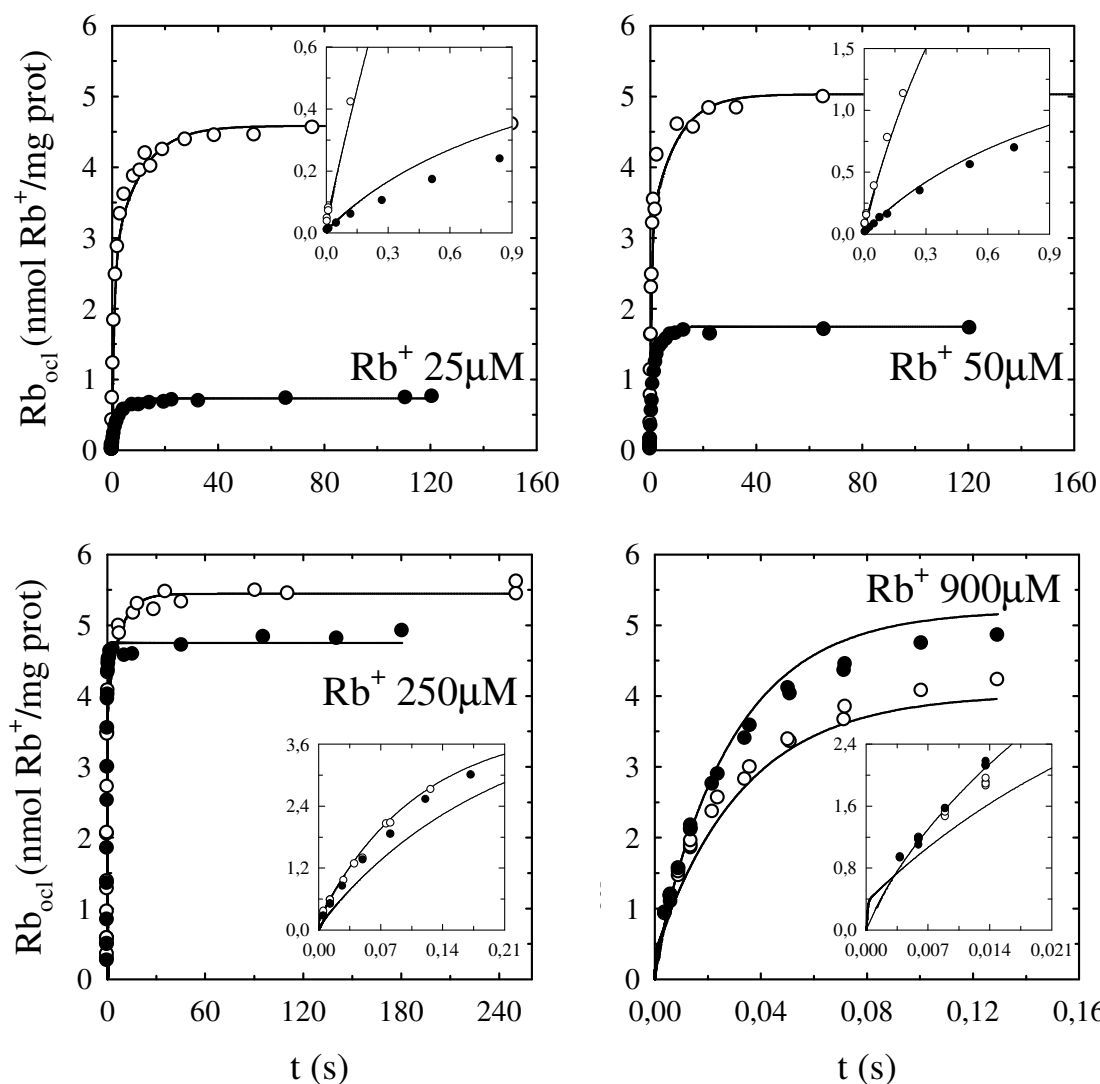
En general, los parámetros obtenidos del ajuste a los resultados simulados y a los resultados experimentales muestran una gran similitud tanto en sus valores como en el cambio que éstos experimentan frente a cambios en la concentración de  $\text{Rb}^+$ . El análisis de ambos conjuntos de resultados proporcionó valores para el coeficiente de velocidad  $k_1$  (Panel C) que aumentan con el incremento de la concentración de  $\text{Rb}^+$  de manera prácticamente lineal y con similar pendiente. Lo mismo puede verse al estudiar la evolución de  $v_{ocl}$  (Panel F). En el caso del coeficiente de velocidad  $k_2$  (Panel D) los valores surgidos del análisis de las simulaciones muestran una dependencia respecto de la concentración del catión más evidente que la observada al analizar los resultados experimentales. Es importante además destacar la capacidad del modelo para predecir con aceptable exactitud los valores de la amplitud de la primera fase muy rápida de oclusión, representada por el parámetro  $Rb_{ocl,0}$  (Panel E).

#### *Cinética de oclusión de $\text{Rb}^+$ en presencia de 200 $\mu\text{M}$ ATP (sección II)*

La Figura VII-7 muestra los resultados experimentales informados en la Figura IV-3, normalizados, junto con los valores de  $\text{Rb}_{ocl}$  predichos por el modelo de la Figura VII-2 para las mismas concentraciones de ligandos.

Existe un razonable acuerdo entre el incremento en el tiempo de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido observada y simulada para todas las condiciones mostradas. No obstante, los gráficos revelan algunos sesgos en el ajuste. Por ejemplo, en el caso de los resultados obtenidos en presencia de 900  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$ , se aprecia que las predicciones del modelo subestiman aquéllos obtenidos en ausencia de ATP y sobreestiman aquéllos correspondientes a medios de incubación con nucleótido.

Sin embargo, a pesar de las desviaciones observadas, el modelo logra reproducir el hecho que la velocidad inicial de oclusión es menor en presencia de ATP en medios de reacción con concentraciones de  $\text{Rb}^+$  de 250  $\mu\text{M}$  o menores, y mayor cuando la concentración de  $\text{Rb}^+$  es de 900  $\mu\text{M}$ .



**Figura VII-7.** Resultados experimentales y simulación de  $\text{Rb}_{\text{oci}}$  como función del tiempo, para medios de reacción carentes de ATP (símbolos vacíos) o que contenían una concentración de ATP de 200  $\mu\text{M}$  (símbolos llenos), y la concentración de  $\text{Rb}^+$  indicada en cada panel. Las líneas de trazo continuo representan las predicciones del modelo de la Figura VII-2 luego de asignar a sus parámetros los valores informados en la Tabla VII-1. Los gráficos insertos muestran un detalle de los resultados correspondientes a las incubaciones más breves.

El análisis de los resultados experimentales y de los simulados, correspondientes a medios de reacción *con* ATP, se llevó a cabo ajustando la Ecuación VII-5 (que se muestra a continuación) para 25, 50 o 250  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$ , o la suma de una única función exponencial y un término constante (Ecuación VII-4) para 900  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$ . Estas ecuaciones son equivalentes a las que fueron empleadas en el Capítulo IV (Ecuaciones IV-4 y IV-2 respectivamente).

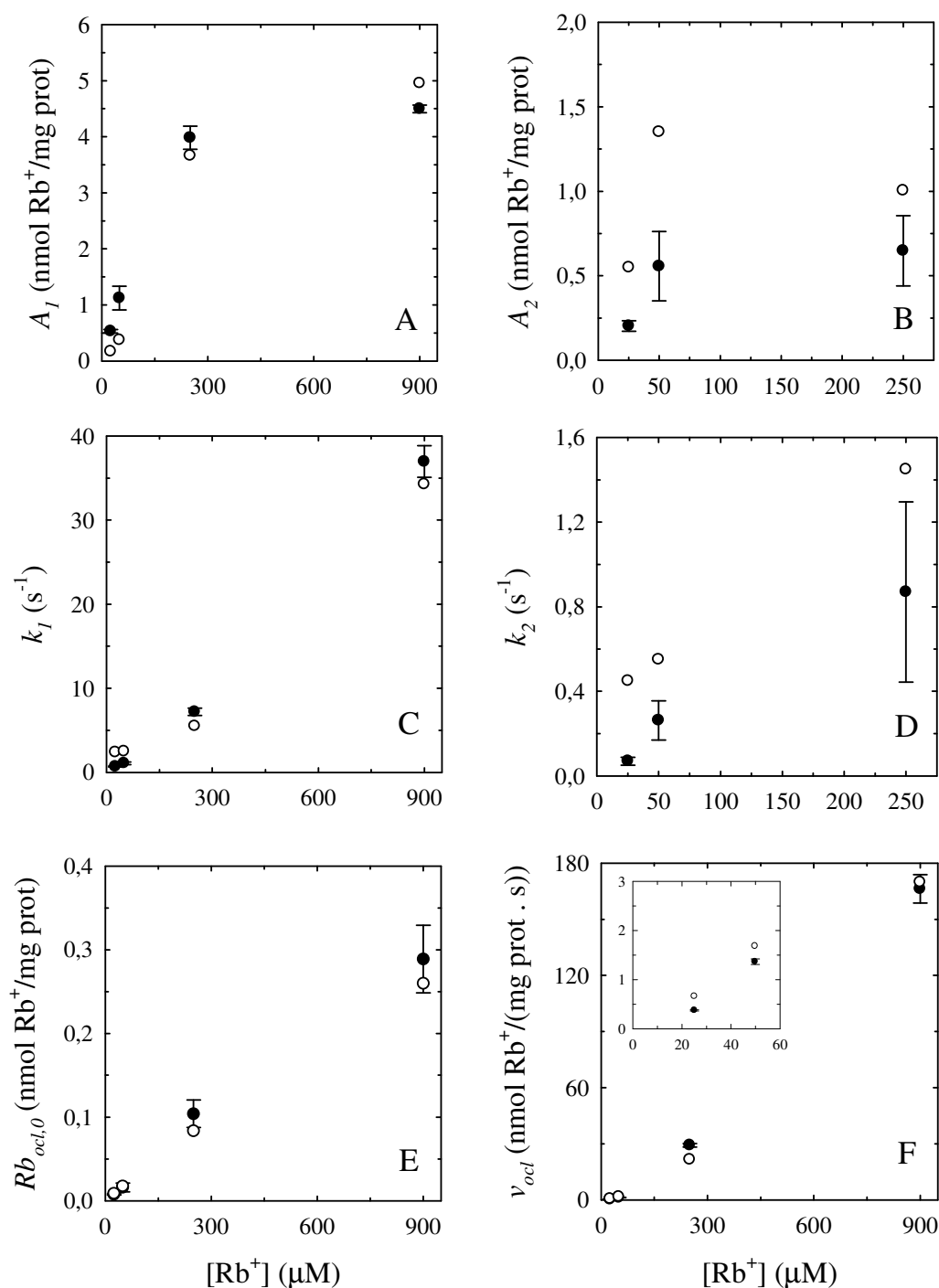
$$\text{Rb}_{\text{ocl}} = \text{Rb}_{\text{ocl},0}(1 - e^{-k_0 t}) + A_1(1 - e^{-k_1 t}) + A_2(1 - e^{-k_2 t}) \quad \text{Ecuación VII-5}$$

Los parámetros que proporcionaron el mejor ajuste de estas ecuaciones están graficados en la Figura VII-8 como función de la concentración de  $\text{Rb}^+$ . Para el parámetro  $k_0$  de la Ecuación VII-5 (no graficado) se obtuvieron valores de  $100 \pm 29 \text{ s}^{-1}$  ( $25 \mu\text{M Rb}^+$ ),  $94 \pm 55 \text{ s}^{-1}$  ( $50 \mu\text{M Rb}^+$ ) y  $213 \pm 138 \text{ s}^{-1}$  ( $250 \mu\text{M Rb}^+$ ) a partir del ajuste a los resultados experimentales, y de  $401 \text{ s}^{-1}$  ( $25 \mu\text{M Rb}^+$ ),  $395 \text{ s}^{-1}$  ( $50 \mu\text{M Rb}^+$ ) y  $379 \text{ s}^{-1}$  ( $250 \mu\text{M Rb}^+$ ) para los resultados simulados.

Los parámetros surgidos del ajuste de las Ecuaciones VII-4 o VII-5 a los resultados simulados siguen una tendencia similar a la que siguen los que brindaron el mejor ajuste a los resultados experimentales. La comparación de los valores que toma cada parámetro en uno y otro caso muestra que existe una muy buena predicción de los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl},0}$  (Panel E),  $k_1$  (Panel C) y  $v_{\text{ocl}}$  (Panel F).

Por otro lado, puede verse que las predicciones del modelo conducen a una subestimación de la amplitud de la fase rápida de oclusión ( $A_1$ , Panel A) para concentraciones de  $\text{Rb}^+$  de  $250 \mu\text{M}$  o menores, que es paralela a una sobreestimación de la amplitud de la fase lenta ( $A_2$ , Panel B). De hecho, para concentraciones de  $\text{Rb}^+$  de  $25$  y  $50 \mu\text{M}$  el modelo predice que  $A_2$  debe ser mayor que  $A_1$ . También se ve que el ajuste a los resultados simulados arrojó valores para  $k_2$  mayores que los surgidos del ajuste a los resultados experimentales. Posiblemente la obtención de estos valores elevados de  $k_2$  responda a la sobreestimación de  $A_2$ , reflejando que se está tratando de ajustar la fase lenta a resultados experimentales que aún corresponden a la fase rápida de oclusión.

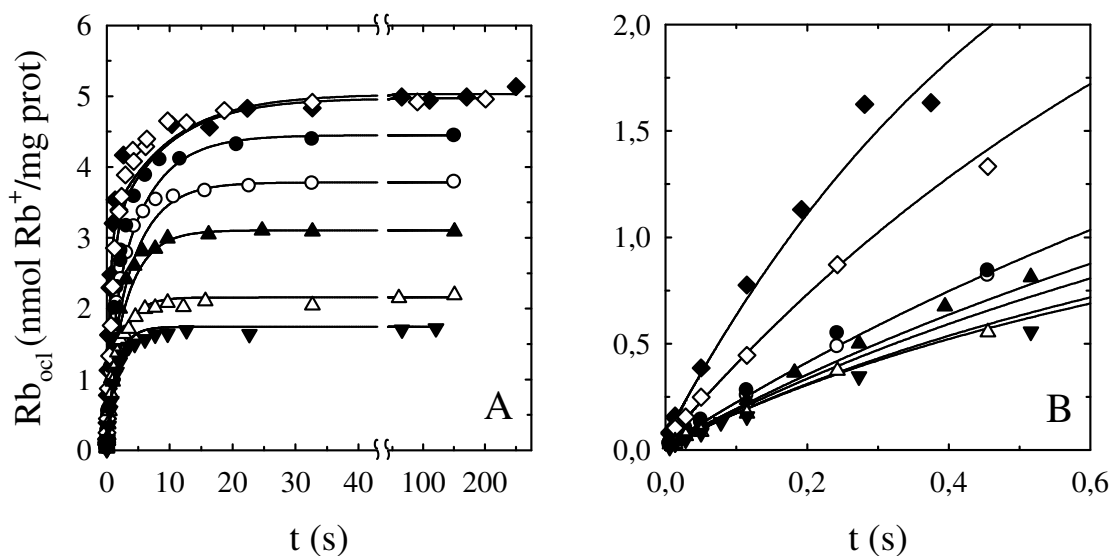




**Figura VII-8.** Paneles A - E: Dependencia respecto de la concentración de  $\text{Rb}^+$  de los parámetros de las Ecuaciones VII-5 (25, 50 y 250  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$ ) y VII-4 (900  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$ ) que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados experimentales (símbolos llenos) o simulados (símbolos vacíos) de la Figura VII-7 correspondientes a medios de reacción con ATP. Nótese que  $A_2$  y  $k_2$  no presentan valores para 900  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$  ya que la ecuación ajustada describe una única fase exponencial. *Panel F:* Velocidad inicial de oclusión, calculada como  $A_1 \cdot k_1 + A_2 \cdot k_2$ . Las barras de error representan  $\pm 1$  error estándar.

*Cinética de oclusión de  $\text{Rb}^+$  en presencia de diferentes concentraciones de ATP (sección III)*

La Figura VII-9 permite comparar los resultados experimentales mostrados en la Figura IV-5 con las correspondientes predicciones de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  que proporciona el modelo ajustado.

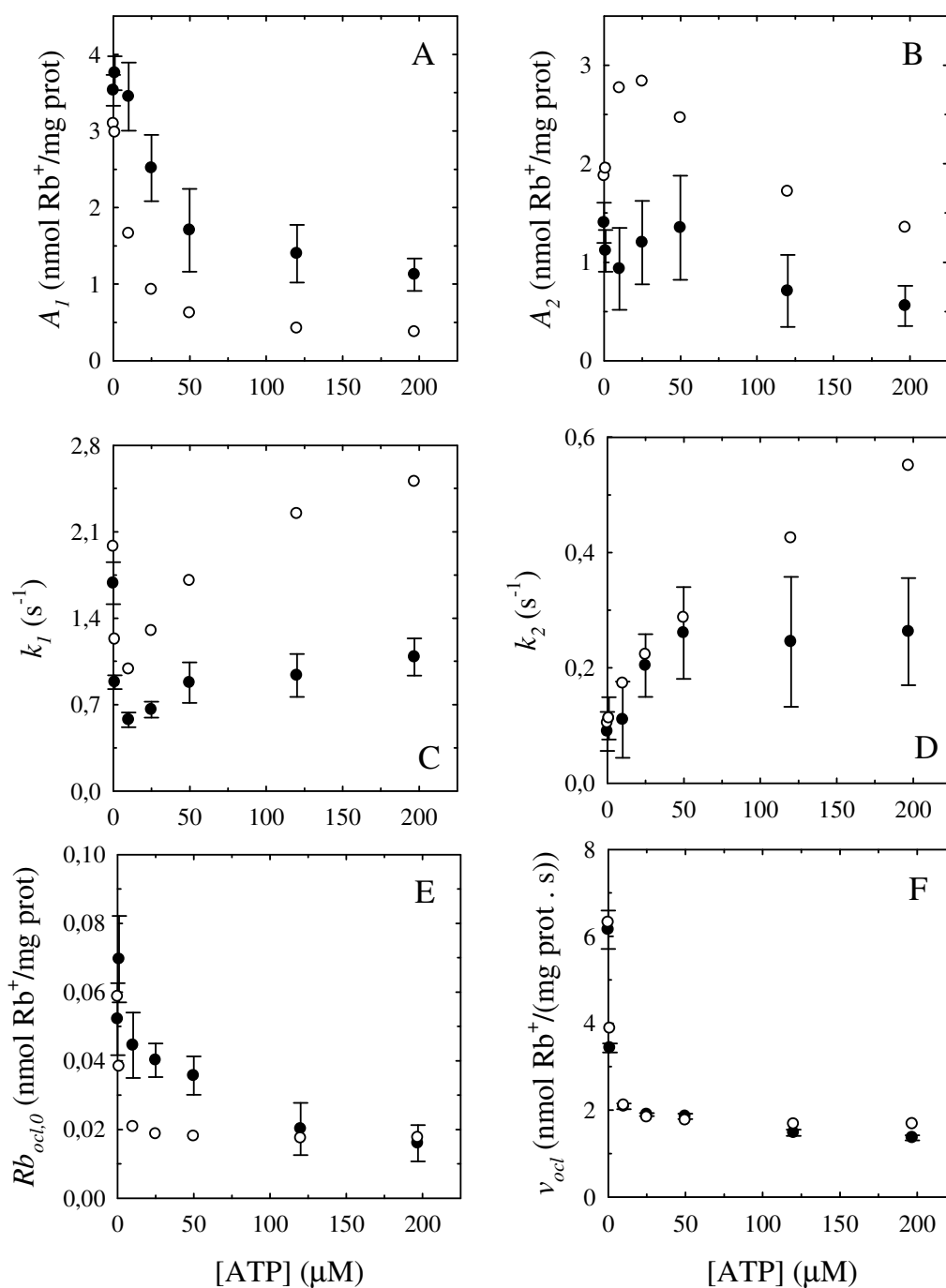


**Figura VII-9.** Cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido como función del tiempo determinada experimentalmente (símbolos) o simulada (líneas continuas), para medios de reacción que contenían 50  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$  y 0 ( $\blacklozenge$ ), 1 ( $\diamond$ ), 10 ( $\bullet$ ), 25 ( $\circ$ ), 50 ( $\blacktriangle$ ), 120 ( $\triangle$ ) o 200 ( $\blacktriangledown$ )  $\mu\text{M}$  ATP. Los resultados experimentales fueron mostrados en la Figura IV-5. El eje de abscisas del Panel A tiene un corte para mostrar más claramente los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  correspondientes a la fase lenta de oclusión. El Panel B es un detalle de las medidas obtenidas empleando tiempos de incubación menores que 0,6 segundos.

Al analizar el Panel A puede verse que el modelo proporciona valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  menores que los obtenidos experimentalmente para la fase lenta de oclusión, excepto para las dos curvas inferiores ( $\triangle$  y  $\blacktriangledown$ , 120 y 200  $\mu\text{M}$  ATP). Para tiempos de incubación inferiores a 0,6 segundos, los desvíos tienen una magnitud mucho menor (Panel B).

Al igual que en Capítulo IV, se ajustó una función constituida por la suma de dos (sólo para valores obtenidos en ausencia de ATP) o de tres funciones exponenciales (Ecuaciones VII-3 y VII-5 respectivamente) a los resultados experimentales y a los simulados para las mismas concentraciones de ATP y tiempos de incubación. Se

obtuvieron así los parámetros que se grafican en la Figura VII-10 como función de la concentración de ATP.



**Figura VII-10.** Paneles A - E: Dependencia respecto de la concentración de ATP de los parámetros de las Ecuaciones VII-3 (sólo para 0  $\mu\text{M}$  ATP) y VII-5 que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados experimentales normalizados (símbolos llenos) o simulados (símbolos vacíos) de la figura VII-9. Panel F: Velocidad inicial de oclusión, calculada como  $A_1 \cdot k_1 + A_2 \cdot k_2$ . Las barras verticales indican  $\pm 1$  error estándar estimado.

Cualitativamente, las predicciones del modelo concuerdan con la información experimental, por cuanto los parámetros proporcionados por el análisis de los valores simulados y de los valores experimentales describen una curva de forma similar al incrementarse la concentración de ATP. Como se pudo comprobar también en las dos secciones anteriores, se obtiene una buena predicción de los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl},0}$  (Panel E) y de  $v_{\text{ocl}}$  (Panel F). En contraste, las medidas simuladas conducen a valores de  $A_2$  elevados (Panel B) y que superan, excepto para concentraciones de ATP de 0 o 1  $\mu\text{M}$ , a los valores de  $A_1$  (Panel A). Es posible que la sobreestimación de la amplitud de la fase lenta de oclusión, y paralelamente, la subestimación de la amplitud de la fase rápida, se deba a que la relación entre los conformeros  $E_1$  y  $E_2$  libres de ATP es demasiado pequeña (ver más arriba “*Velocidad del cambio conformacional entre las especies  $E_1\text{Rb}_n$  y  $E_2(\text{Rb})_n$* ”). Esta relación  $E_1 / E_2$  podría ser insuficiente para que exista una proporción de  $E_1$  que permita que la fase rápida reproduzca la observada experimentalmente, y consecuentemente la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en la fase lenta debería forzosamente ser mayor para alcanzar valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el equilibrio comparables a los experimentales.

En el caso de los coeficientes de velocidad, puede verse que los valores de  $k_1$  (Panel C) superan a los que surgen de los resultados experimentales, de forma tanto más evidente cuanto mayor es la concentración del nucleótido, mientras que los de  $k_2$  (Panel D) sólo muestran diferencias marcadas para las concentraciones de ATP superiores a 100  $\mu\text{M}$ .

### ***Efectos del $\text{Rb}^+$ y del ATP sobre la cinética de liberación de $\text{Rb}^+$ ocluido (Capítulo V)***

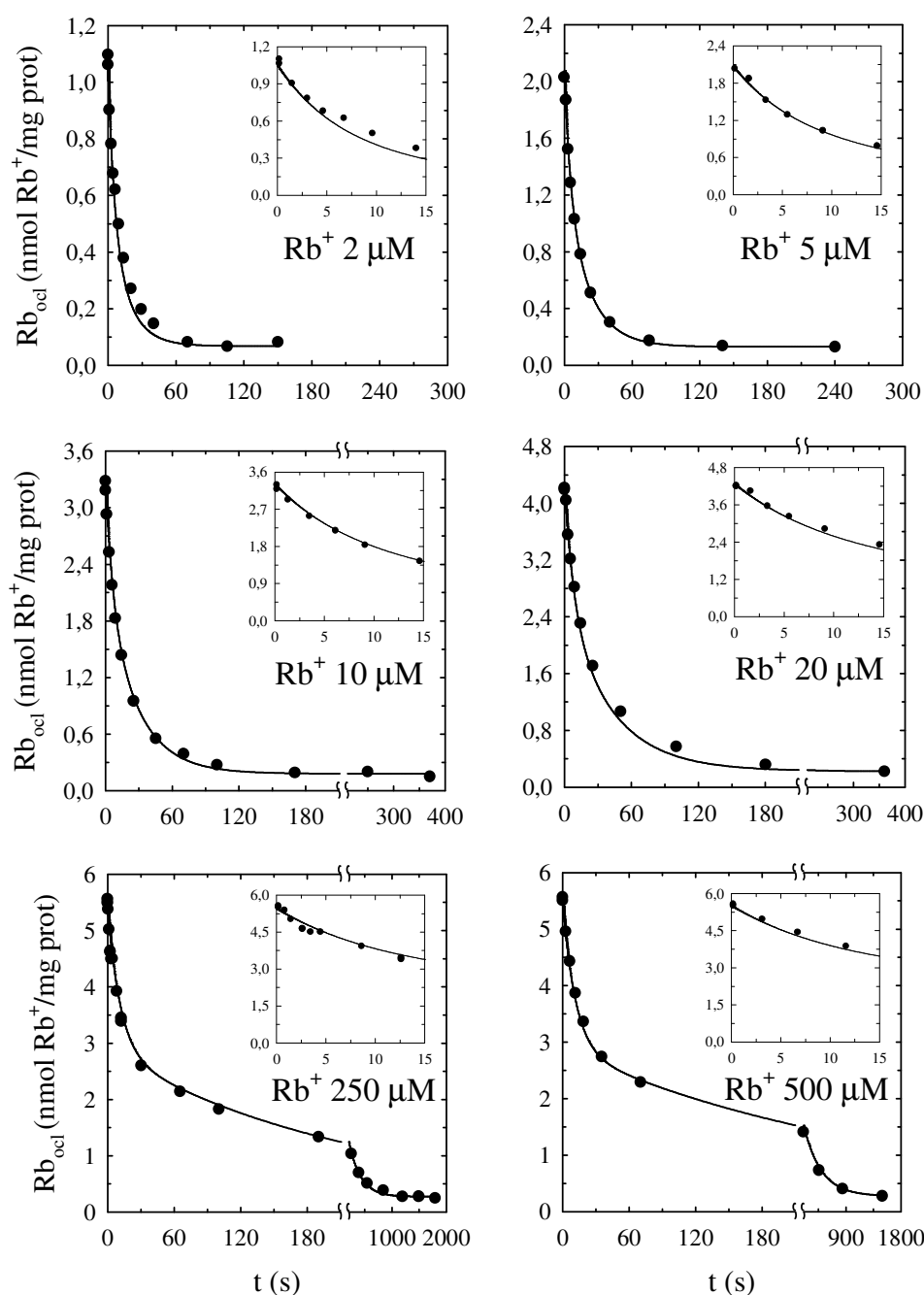
De manera análoga a lo expuesto en las secciones anteriores, se generaron valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  que describen la cinética de desoclusión de  $\text{Rb}^+$  predicha por el modelo de la Figura VII-2 en las mismas condiciones que las empleadas para obtener los resultados experimentales de las Figuras V-1, V-3, V-6, V-8 y V-9.

*Efectos del  $\text{Rb}^+$  sobre la liberación de  $\text{Rb}^+$  ocluido en ausencia de ATP y en condiciones de equilibrio termodinámico (sección I)*

En la Figura VII-11 se presentan los resultados experimentales de la Figura V-1, normalizados, junto con la predicción que de ellos proporciona el modelo de la Figura VII-2.

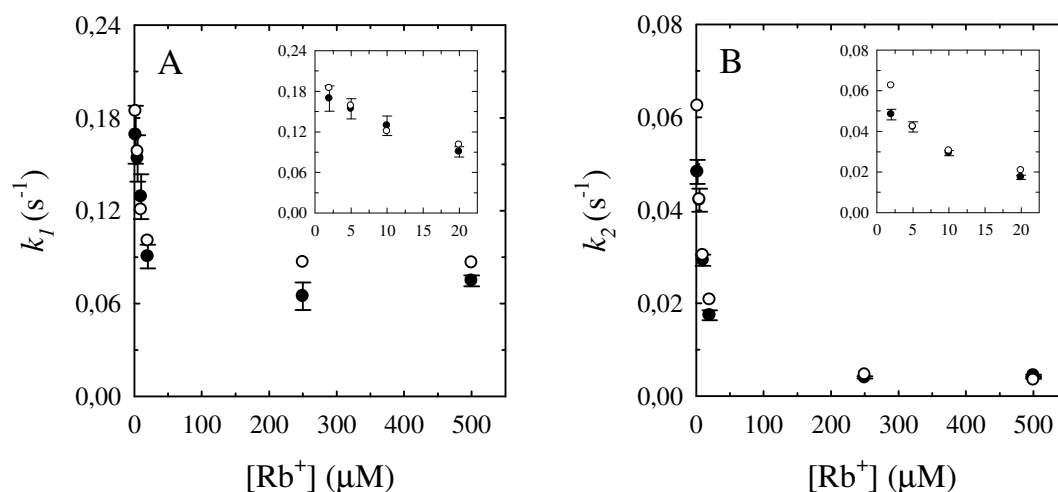
Las predicciones del modelo concuerdan muy bien con los resultados experimentales para todas las concentraciones de  $\text{Rb}^+$  estudiadas. La Ecuación VII-6, idéntica a la V-1, fue ajustada tanto a los resultados experimentales como a los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  simulados para los mismos tiempos de reacción y concentración de  $\text{Rb}^+$ :

$$\text{Rb}_{\text{ocl}} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + \text{Rb}_{\text{ocl}, \infty} \quad \text{Ecuación VII-6}$$



**Figura VII-11.** Resultados experimentales (símbolos) y simulación (línea continua) de la cinética de desocclusión de  $\text{Rb}^+$  en medios de reacción libres de ATP y que contenían las concentraciones de  $\text{Rb}^+$  indicadas en cada panel. Los símbolos reproducen los resultados experimentales mostrados en la Figura V-1. Las líneas de trazo continuo representan las predicciones del modelo de la Figura VII-2 luego de asignar a sus parámetros los valores informados en la Tabla VII-1. Los gráficos insertos muestran los resultados obtenidos para tiempos de incubación menores que 15 segundos.

Como se explicó en el Capítulo V, el mejor ajuste de la Ecuación VII-6 a los resultados experimentales, sobre la base del criterio AICc, se obtiene cuando se supone que  $A_1$  y  $A_2$  son equivalentes. Por lo tanto, en este caso impusimos la misma restricción. La Figura VII-12 muestra cómo varía el valor ajustado de los coeficientes  $k_1$  y  $k_2$  con la concentración de  $\text{Rb}^+$  al analizar los resultados experimentales y los simulados.

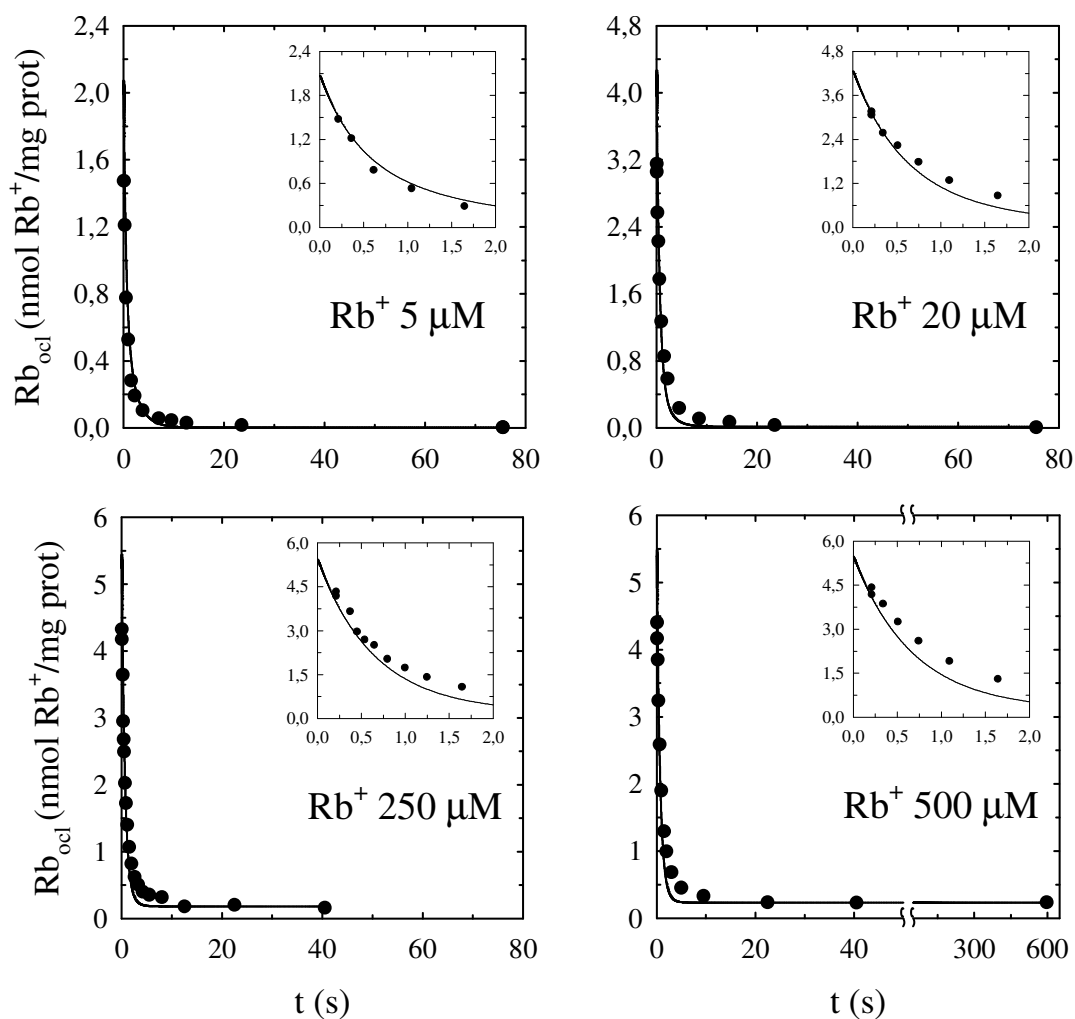


**Figura VII-12.** Dependencia respecto de la concentración de  $\text{Rb}^+$  de los parámetros  $k_1$  (Panel A) y  $k_2$  (Panel B) de la Ecuación VII-6 que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados experimentales (símbolos llenos) o simulados (símbolos vacíos) de la Figura VII-11. Los valores representados por símbolos llenos coinciden con los graficados en la Figura V-2. Las barras verticales indican el error estándar estimado.

Puede verse que, para ambos coeficientes, el ajuste a los resultados experimentales o a los resultados simulados proporcionó valores similares y que disminuyen de la misma forma con la concentración de  $\text{Rb}^+$ .

#### *Efectos del $\text{Rb}^+$ sobre la liberación de $\text{Rb}^+$ ocluido en presencia de 2 mM ATP (sección II)*

Se muestran en la Figura VII-13 los resultados experimentales tomados de la Figura V-3, normalizados, junto con los correspondientes valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  simulados.



**Figura VII-13.** Cinética de liberación de  $\text{Rb}^+$  ocluido en presencia de 2 mM ATP. Los medios de reacción donde se llevó a cabo la desoclusión contenían la concentración de  $\text{Rb}^+$  indicada en cada panel. Se grafican con símbolos llenos los resultados experimentales mostrados en la Figura V-3 luego de ser normalizados, y con líneas la predicción que de ellos proporciona el modelo de la Figura VII-2. Los gráficos insertos detallan los resultados correspondientes a los primeros dos segundos de reacción.

Es posible apreciar que existe un leve sesgo en el ajuste, aunque en general el modelo proporciona una buena predicción de los resultados experimentales.

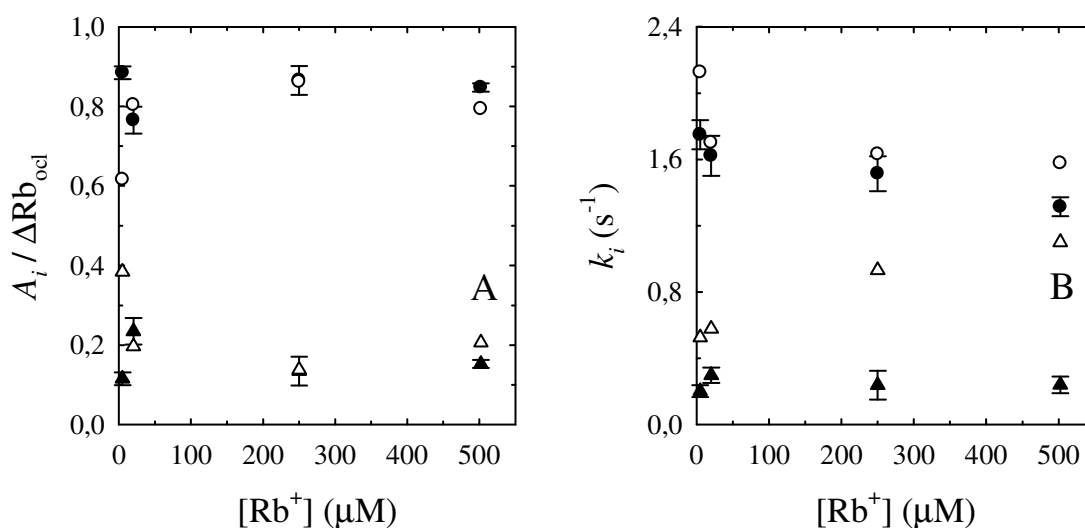
Al analizar los resultados experimentales de la Figura V-3, explicamos que el mejor ajuste se había obtenido con la Ecuación V-3, que transcribimos a continuación como Ecuación VII-7:

$$\text{Rb}_{\text{oci}} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + A_3 e^{-k_3 t} + \text{Rb}_{\text{oci},\infty} \quad \text{Ecuación VII-7}$$



El tercer término exponencial describía una fase de desoclusión residual muy lenta y de pequeña amplitud que no pudimos explicar (ver Capítulo V, sección II y anexo a ese capítulo) ni reproducir con el modelo de la Figura VII-2 u otros modelos alternativos. Entonces nos limitamos a buscar un modelo que pudiera reproducir las primeras dos fases, siendo necesario normalizar los resultados experimentales antes del ajuste para eliminar esa fase residual y así evitar que su presencia perjudicara el ajuste de las fases mayoritarias (ver anexo a este capítulo). Como consecuencia, en lugar de la Ecuación VII-7, se ajustó la suma de sólo dos funciones exponenciales decrecientes y un término constante (Ecuación VII-6) a los resultados experimentales normalizados y a los correspondientes valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  simulados. Esta aclaración es válida también para las siguientes secciones.

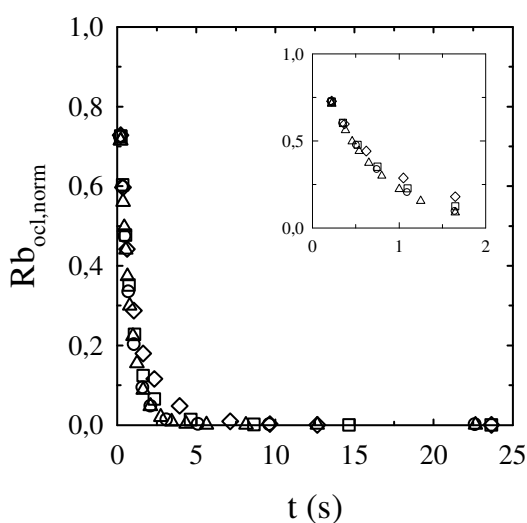
La Figura VII-14 permite comparar el valor que toman los parámetros  $A_1$  y  $A_2$  (ambos expresados como fracción de la suma  $A_1 + A_2$ , que llamamos  $\Delta\text{Rb}_{\text{ocl}}$ ),  $k_1$  y  $k_2$  al ajustar la Ecuación VII-6 a los resultados experimentales normalizados y a los valores simulados de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  de la Figura VII-13.



**Figura VII-12.** Amplitudes (Panel A) y coeficientes de velocidad (Panel B) de las fases rápida (círculos) y lenta (triángulos) de liberación de  $\text{Rb}^+$  ocluido en medios de reacción que contenían 2 mM ATP, como función de la concentración de  $\text{Rb}^+$ . Los parámetros fueron obtenidos por ajuste de la Ecuación VII-6 a los resultados experimentales (símbolos llenos) o simulados (símbolos vacíos) presentados en la Figura VII-13. Las amplitudes se expresan como fracción del cambio total observado  $\Delta\text{Rb}_{\text{ocl}} = A_1 + A_2$ . Las barras verticales indican la magnitud del error estándar estimado para ese parámetro.

Al comparar los valores proporcionados por el ajuste de la Ecuación VII-6 a las medidas experimentales o a las generadas a partir del modelo, se aprecia que en un caso y en otro se obtienen valores similares para  $A_1$ ,  $A_2$  y para el coeficiente de velocidad  $k_1$ , excepto para la concentración más baja de  $\text{Rb}^+$  estudiada. Los valores de  $k_2$ , en cambio, presentan menor superposición, siendo los valores surgidos del ajuste a los resultados simulados mayores en todo el intervalo de concentraciones de  $\text{Rb}^+$ .

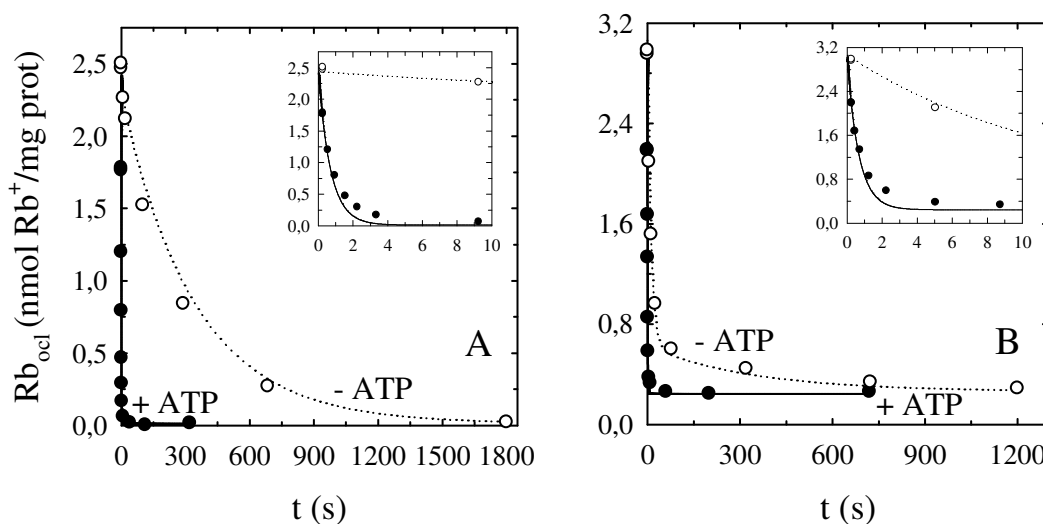
A pesar de estas desviaciones respecto de la información experimental, es importante destacar que el modelo logra reproducir el hecho de que, para las cuatro concentraciones de  $\text{Rb}^+$  estudiadas, se obtienen curvas de desocclusión superponibles al normalizar cada medida de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  para expresarla como una fracción del cambio máximo (Figura VII-13). Esto había sido comprobado para las medidas experimentales y mostrado en el Capítulo V (Figura V-5).



**Figura VII-13.** Comparación de las medidas simuladas de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  mostradas en la Figura VII-11, normalizadas empleando la ecuación  $\text{Rb}_{\text{ocl, norm}} = (\text{Rb}_{\text{ocl}} - \text{Rb}_{\text{ocl, } \infty}) / (A_1 + A_2)$ , donde  $\text{Rb}_{\text{ocl, } \infty}$ ,  $A_1$  y  $A_2$  son los parámetros de la Ecuación VII-6 ajustada a las medidas del correspondiente experimento. Sólo se grafican las medidas simuladas para los mismos tiempos de incubación que los correspondientes a los resultados experimentales graficados con símbolos en la Figura VII-11. Los símbolos corresponden a las siguientes concentraciones de  $\text{Rb}^+$ : 5 ( $\diamond$ ), 20 ( $\square$ ), 250 ( $\triangle$ ) y 500 ( $\circ$ )  $\mu\text{M}$ . El gráfico inserto detalla los primeros dos segundos de reacción.

*Cinética de desoclusión de  $\text{Rb}^+$  localizado selectivamente en uno de los sitios de oclusión, en ausencia y en presencia de 2 mM ATP (sección IV)*

A continuación (Figura VII-14) se muestra la capacidad del modelo de la Figura VII-2 para predecir la cinética de liberación de  $^{86}\text{Rb}^+$  cuando éste se halla ocluido selectivamente en el sitio *s* o el sitio *f*, en medios de reacción libres de ATP o en presencia de 2 mM ATP. La figura incluye la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido determinada experimentalmente en esas condiciones, presentada anteriormente en las Figuras V-8 y V-9.



**Figura VII-14.** Cinética de liberación de  $^{86}\text{Rb}^+$  localizado selectivamente en el sitio *s* (Panel A) o en el sitio *f* (Panel B). Los símbolos representan los resultados experimentales obtenidos en medios de reacción que contenían  $\text{Rb}^+$  1 mM y ATP 0 (○) o 2 mM (●), tomados de las Figuras V-8 y V-9, respectivamente. Las líneas corresponden a los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  predichos por el modelo de la Figura VII-2 para las mismas condiciones. Los gráficos insertos muestran un detalle de los primeros 10 segundos de reacción.

Al inspeccionar la figura puede comprobarse que los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  generados por el modelo se superponen en la mayoría de los casos con los resultados experimentales, aunque se observa nuevamente que no pudo obtenerse una buena predicción de la fase lenta de desoclusión observada en presencia de ATP (ver línea continua en los gráficos insertos para tiempos de incubación cercanos a 3 segundos). De hecho, pudo comprobarse mediante análisis por regresión de los resultados simulados para medios de

reacción con ATP, que éstos no muestran una fase lenta de desoclusión equiparable a la segunda fase observada experimentalmente, siendo adecuadamente descriptos por una única función exponencial decreciente. Por lo tanto, se ajustó la siguiente función a dichos resultados, en lugar de la Ecuación VII-6:

$$\text{Rb}_{\text{ocl}} = A_1 e^{-k_1 t} + \text{Rb}_{\text{ocl}, \infty} \quad \text{Ecuación VII-8}$$

En cambio, se empleó la Ecuación VII-6 para describir los resultados experimentales obtenidos tanto en ausencia como en presencia de ATP, así como los simulados para medios de reacción sin ATP. El valor de los parámetros que surgió del ajuste de las Ecuaciones VII-6 o VII-8 se informa en la Tabla VII-2.

**Tabla VII-2.** Resultados del ajuste de los parámetros  $A_1$ ,  $k_1$ ,  $A_2$  y  $k_2$  de las Ecuaciones VII-6 o VII-8 a los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  experimentales y simulados de la Figura VII-14.

**Panel A (Sitio s)**

- ATP			
Parámetro	$\text{Rb}_{\text{ocl}}$ experimental Valor $\pm$ E.S.	$\text{Rb}_{\text{ocl}}$ simulado Valor	Unidades
$A_1$	$0,433 \pm 0,059$ (17,5%)	$0,1664$ (6,9%)	nmol $\text{Rb}^+$ / (mg prot)
$k_1$	$0,043 \pm 0,012$	$0,08719$	$\text{s}^{-1}$
$A_2$	$2,035 \pm 0,055$ (82,5%)	$2,259$ (93,1%)	nmol $\text{Rb}^+$ / (mg prot)
$k_2$	$(3,05 \pm 0,11) \cdot 10^{-3}$	$2,91 \cdot 10^{-3}$	$\text{s}^{-1}$
+ ATP 2 mM			
Parámetro	$\text{Rb}_{\text{ocl}}$ experimental Valor $\pm$ E.S.	$\text{Rb}_{\text{ocl}}$ simulado Valor	Unidades
$A_1$	$2,159 \pm 0,052$ (87,5%)	$2,388$	nmol $\text{Rb}^+$ / (mg prot)
$k_1$	$1,471 \pm 0,059$	$1,418$	$\text{s}^{-1}$
$A_2$	$0,310 \pm 0,050$ (12,5%)		nmol $\text{Rb}^+$ / (mg prot)
$k_2$	$0,208 \pm 0,044$		$\text{s}^{-1}$

**Tabla VII-2 (Continuación).** Resultados del ajuste de los parámetros  $A_1$ ,  $k_1$ ,  $A_2$  y  $k_2$  de las Ecuaciones VII-6 o VII-8 a los valores de  $Rb_{ocl}$  experimentales y simulados de la Figura VII-14.

**Panel B (Sitio *f*)**

- ATP			
Parámetro	$Rb_{ocl}$ experimental Valor $\pm$ E.S.	$Rb_{ocl}$ simulado Valor	Unidades
$A_1$	$2,300 \pm 0,052$ (84,6%)	2,438 (87,1%)	nmol Rb <sup>+</sup> / (mg prot)
$k_1$	$0,0853 \pm 0,0045$	0,08676	s <sup>-1</sup>
$A_2$	$0,418 \pm 0,038$ (15,4%)	0,3597 (12,9%)	nmol Rb <sup>+</sup> / (mg prot)
$k_2$	$(2,81 \pm 0,73) \cdot 10^{-3}$	$2,94 \cdot 10^{-3}$	s <sup>-1</sup>

+ ATP 2 mM			
Parámetro	$Rb_{ocl}$ experimental Valor $\pm$ E.S.	$Rb_{ocl}$ simulado Valor	Unidades
$A_1$	$2,332 \pm 0,091$ (85,2%)	2,777	nmol Rb <sup>+</sup> / (mg prot)
$k_1$	$1,61 \pm 0,10$	1,500	s <sup>-1</sup>
$A_2$	$0,406 \pm 0,092$ (14,8%)		nmol Rb <sup>+</sup> / (mg prot)
$k_2$	$0,216 \pm 0,052$		s <sup>-1</sup>

Los valores fueron obtenidos ajustando las Ecuaciones VII-6 o VII-8 (sólo para medidas de  $Rb_{ocl}$  simuladas en presencia de ATP) a los valores de  $Rb_{ocl}$  experimentales o simulados mostrados en el panel indicado de la Figura VII-14. En los casos en que se informan valores para más de una fase de desoclusión, junto al valor ajustado para cada fase se muestra entre paréntesis el porcentaje del cambio máximo en  $Rb_{ocl}$  ( $A_1 + A_2$ ) por ella representado.

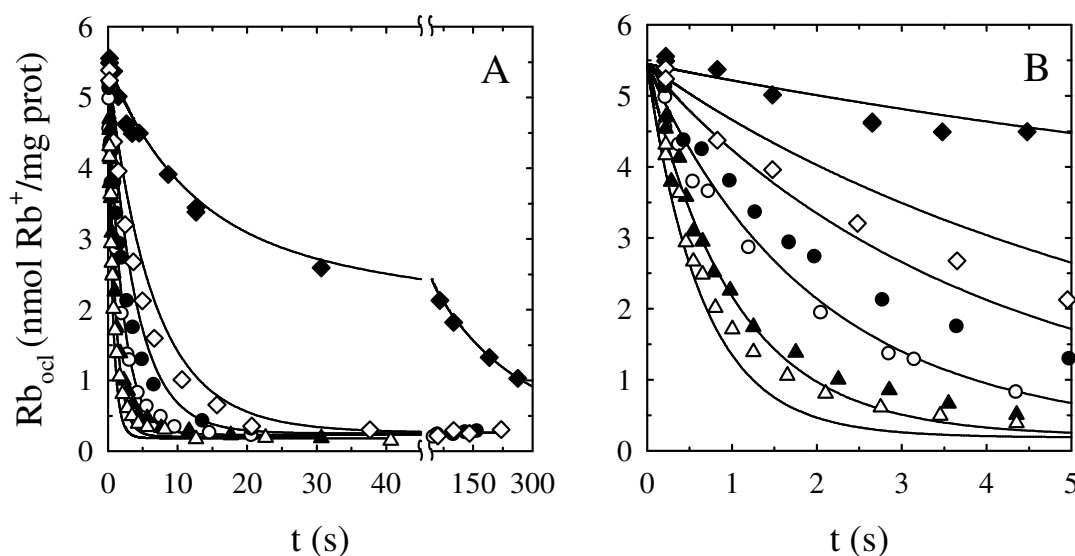
En todos los casos, independientemente de que el medio de reacción contuviese o no ATP o de que el  $^{86}Rb^+$  estuviese localizado en el sitio *s* o el *f*, el ajuste a las medidas experimentales y a las correspondientes medidas simuladas proporcionó valores de parámetros similares, tanto para las amplitudes de cada fase de desoclusión como para sus coeficientes de velocidad.

Es importante recalcar también que, aunque el modelo no logra reproducir la fase lenta de desoclusión observada en presencia de ATP, reproduce satisfactoriamente la fase

rápida (que representa más del 85% de la disminución total de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$ ), y proporciona, al igual que los resultados experimentales, cinéticas prácticamente coincidentes para la liberación inducida por ATP del  $^{86}\text{Rb}^+$  localizado selectivamente en uno u otro de los sitios de oclusión.

*Cinética de desoclusión de  $\text{Rb}^+$  en presencia de diferentes concentraciones de ATP (sección III)*

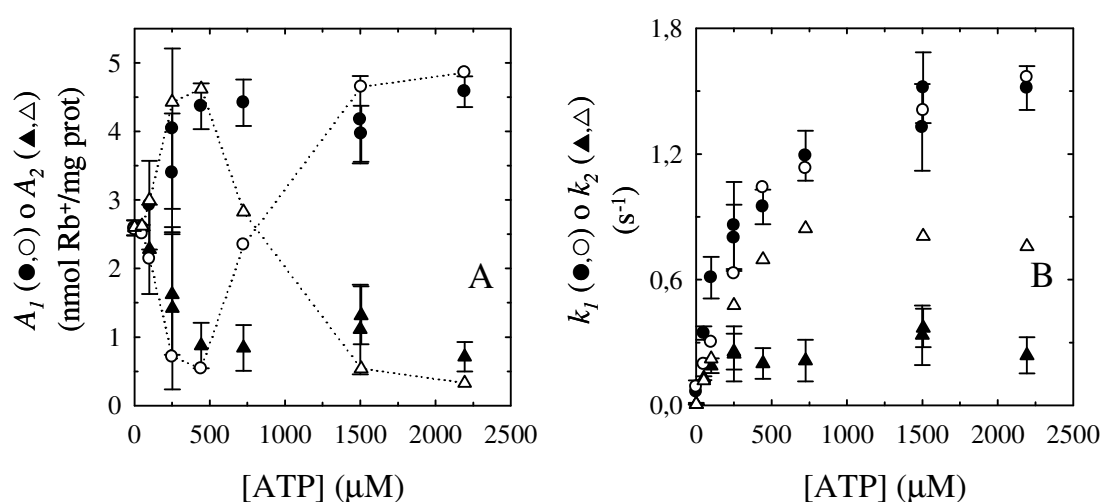
En la Figura VII-15 se muestran, con símbolos, los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  obtenidos al estudiar la liberación de  $\text{Rb}^+$  ocluido empleando concentraciones de ATP entre 0 y 2 mM. Con líneas de trazo continuo se grafican los valores que proporciona el modelo de la Figura VII-2 para las mismas condiciones.



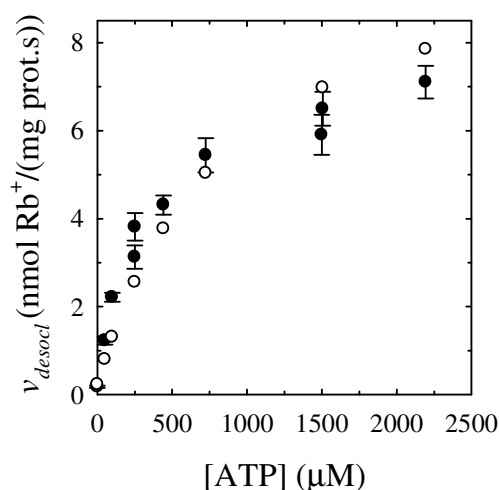
**Figura VII-15.** Cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido como función del tiempo determinada experimentalmente (símbolos) o simulada (líneas continuas), en presencia de 250  $\mu\text{M}$   $\text{Rb}^+$  y 0 ( $\blacklozenge$ ), 50 ( $\diamond$ ), 100 ( $\bullet$ ), 250 ( $\circ$ ), 725 ( $\blacktriangle$ ) o 2200 ( $\triangle$ )  $\mu\text{M}$  ATP. Los resultados experimentales fueron mostrados anteriormente en la Figura V-6. El panel de la derecha es un detalle de las medidas correspondientes a tiempos de incubación menores que 5 segundos.

En general, los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  simulados concuerdan con los resultados experimentales, aunque es evidente cierto sesgo en el ajuste. Como explicamos anteriormente, si bien el mejor ajuste a los resultados experimentales obtenidos en

presencia de ATP se había conseguido con la suma de tres funciones exponenciales y un término independiente del tiempo (Ecuación VII-7, idéntica a la V-3), la normalización efectuada hace que los resultados normalizados y las simulaciones correspondientes deban ser descriptos por la Ecuación VII-6. Esta ecuación fue ajustada a dichos resultados, obteniéndose los parámetros que se grafican en la Figura VII-16 como función de la concentración de ATP. Por otro lado, la Figura VII-17 permite comparar la velocidad inicial de desoclusión ( $v_{desocl}$ ) calculada a partir de los resultados experimentales o de los simulados.



**Figura VII-16.** Dependencia respecto de la concentración de ATP de los parámetros de la Ecuación VII-6 que proporcionaron el mejor ajuste a los resultados experimentales (símbolos llenos) o simulados (símbolos vacíos) de la Figura VII-15. Las líneas que conectan los símbolos vacíos en el Panel A fueron agregadas sólo para hacer más clara la tendencia de los valores. Las barras verticales indican el error estándar estimado.



**Figura VII-17.** Dependencia respecto de la concentración de ATP de la velocidad inicial de desoclusión de  $\text{Rb}^+$ , calculada a partir de los parámetros de la Ecuación VII-6 ajustada a los resultados experimentales (símbolos llenos) o simulados (símbolos vacíos) de la Figura VII-15. La velocidad fue calculada como  $A_1 \cdot k_1 + A_2 \cdot k_2$ . Las barras verticales representan  $\pm 1$  error estándar estimado.

La inspección del Panel A de la Figura VII-16 permite ver que sólo para las concentraciones más elevadas de ATP existe una coincidencia entre los valores de  $A_1$  y de  $A_2$  obtenidos del ajuste a los resultados simulados y los resultados experimentales. Es llamativo que, en el caso de las concentraciones de ATP más bajas, los valores de  $A_1$  surgidos del ajuste a los resultados simulados se superpongan con los de  $A_2$  obtenidos a partir de los resultados experimentales, y *vice versa*. Al respecto, es oportuno mencionar que el ajuste a los resultados simulados, al partir de diferentes parámetros iniciales, tendía a proporcionar diferentes conjuntos de parámetros que correspondían a diferentes mínimos locales de la función suma de cuadrados (SC). Los valores graficados corresponden al conjunto de parámetros para el que se obtuvo el *menor* valor de SC. Sin embargo, ajustes alternativos condujeron a valores de  $A_1$  y  $A_2$  cercanos a los obtenidos del ajuste a los resultados experimentales para todas las concentraciones de ATP, aunque asociados a una SC mayor. Creemos que el comportamiento de los parámetros  $A_1$  y  $A_2$  durante el ajuste sería en parte consecuencia de la similitud en los valores de  $k_1$  y  $k_2$  para concentraciones de ATP menores que  $500 \mu\text{M}$  (ver símbolos vacíos en el Panel B), lo que dificulta discernir los límites entre una y otra fase.



Por otro lado, el panel B de la figura VII-16 y la figura VII-17 muestran que, mientras que existe una muy buena predicción de los valores de  $k_1$  y de la velocidad inicial de desoclusión, los resultados simulados proporcionan valores de  $k_2$  superiores a los proporcionados por los resultados experimentales.

### ***Comentarios finales***

En conclusión, puede afirmarse luego de analizar las secciones precedentes que, en la mayoría de los casos, el modelo de la Figura VII-2 proporciona una buena descripción de la evolución de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en condiciones de equilibrio, y de las cinéticas de oclusión y desoclusión de  $\text{Rb}^+$ , en medios de reacción con diferentes concentraciones de  $\text{Rb}^+$  y ATP. Esto se ha comprobado mostrando que los valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  proporcionados por el modelo concuerdan con los obtenidos experimentalmente y describen curvas de forma similar. Además, se pudo verificar que el ajuste de las mismas ecuaciones empíricas a los resultados experimentales y a los resultados simulados para las mismas condiciones proporciona parámetros comparables, y que evolucionan de manera similar frente a cambios en la variable de análisis. Merece destacarse a su vez que el modelo ajustado logra reproducir fenómenos relevantes asociados a la acción moduladora del ATP sobre el transporte de  $\text{K}^+$  y sus congéneres, como la inhibición del efecto del  $\text{Rb}^+$  sobre la velocidad de desoclusión. Esto es sugerido por la superposición de las curvas de desoclusión obtenidas en presencia de ATP y diferentes concentraciones del catión (Figura VII-13), o el hecho de que la liberación de  $\text{Rb}^+$  desde uno u otro de los sitios de oclusión muestre una cinética prácticamente coincidente en presencia del nucleótido (Tabla VII-2).

Entre las principales falencias del modelo debemos mencionar la dificultad para generar una adecuada predicción de las fases lentas de oclusión o de desoclusión en presencia de ATP, obteniéndose valores para su amplitud o su coeficiente de velocidad que no concuerdan con los experimentales. Como mencionamos, al menos en el primer caso, esto puede deberse a que el ajuste haya proporcionado un valor demasiado pequeño para la relación entre los conformeros  $E_1$  y  $E_2$  (0,2), alrededor de tres veces inferior al valor determinado experimentalmente por otros autores ( $\sim 0,7$ , ver pág. 159: “*Velocidad del cambio conformacional entre las especies  $E_1\text{Rb}_n$  y  $E_2(\text{Rb})_n$* ”).

Sin embargo, teniendo en cuenta que en prácticamente todos los casos el ajuste es *cualitativamente* correcto, sería razonable pensar que las diferencias cuantitativas encontradas están más relacionadas con el hecho de que no se obtuvo el mejor ajuste posible a la información empírica, más que con problemas inherentes a la formulación del modelo.



---

# ANEXO AL CAPÍTULO VII

## *I. Normalización de los resultados experimentales*

Como se explicó anteriormente, con el objeto de reducir la variación entre experimentos y hacer comparables resultados obtenidos en diferentes días y con diferentes protocolos experimentales, se procedió a normalizar los resultados experimentales antes del ajuste del modelo de la Figura VII-2. El procedimiento empleado se describe a continuación. La normalización de las medidas de  $Rb_{ocl}$  en condiciones de equilibrio fue explicada en Materiales y Métodos (“*Normalización de medidas de  $Rb^+$  ocluido en el equilibrio*”), por lo que ahora nos centraremos en las medidas de la evolución en el tiempo de la oclusión (Capítulo IV) o desoclusión de  $Rb^+$  (Capítulo V).

Es importante recalcar que en todos los casos la normalización constituyó una transformación lineal de los resultados experimentales, por lo que no se vio alterada la forma en que estaban distribuidos los errores aleatorios originales.

*Normalización de las medidas de  $Rb_{ocl}$  como función del tiempo obtenidas en experimentos de oclusión*

Las medidas de cada experimento fueron normalizadas aplicando la siguiente fórmula:

$$y_{ij,norm} = f_j \cdot y_{ij}$$

donde  $y_{ij}$  es la medida  $i$  del experimento  $j$ ,  $y_{ij,norm}$  es la misma medida normalizada, y  $f_j$  es el factor de normalización propio del experimento  $j$ . El factor  $f_j$  fue calculado como:

$$f_j = \frac{Rb_{ocl\ máx,esp}}{Rb_{ocl\ máx,j}}$$

siendo  $Rb_{ocl\ máx,j}$  la máxima cantidad de  $Rb^+$  ocluido obtenida en el experimento  $j$ , surgida del ajuste de la función empírica correspondiente, y  $Rb_{ocl\ máx,esp}$  la predicha por el modelo presentado en el Capítulo III (Esquema III-1) considerando las concentraciones de  $Rb^+$  y de ATP empleadas.

En todos los casos en que no se obtuvieron medidas correspondientes al equilibrio, y por lo tanto no se contaba con una estimación confiable de  $Rb_{ocl\ máx,j}$ , se consideró que el factor  $f_j$  era igual a uno. En el resto de los casos, los factores  $f_j$  calculados tuvieron un valor promedio de 0,96 y un desvío estándar de 0,13.

*Normalización de las medidas de  $Rb_{ocl}$  como función del tiempo obtenidas en experimentos de desoclusión*

Como se explicó en el Capítulo V, las medidas de  $Rb_{ocl}$  obtenidas en ausencia o en presencia de ATP fueron adecuadamente descriptas respectivamente por las ecuaciones Empíricas V-1 y V-3, que reproducimos a continuación:

$$Rb_{ocl} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + Rb_{ocl,\infty} \quad \text{Ecuación V-1}$$

$$Rb_{ocl} = A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t} + A_3 e^{-k_3 t} + Rb_{ocl,\infty} \quad \text{Ecuación V-3}$$

No nos fue posible identificar el origen de la tercera fase de liberación observada en presencia del nucleótido, caracterizada por el tercer término exponencial en V-3 (para más detalles, ver anexo al Capítulo V), ni construir modelos cinéticos que logran reproducirla. Nos limitamos entonces a encontrar un modelo que pudiera reproducir las primeras dos fases, siendo necesario eliminar la fase residual para evitar desviaciones sistemáticas en los ajustes. Así, en primer lugar, se restó esa fase de las medidas de liberación de  $Rb^+$  ocluido inducida por ATP con la siguiente ecuación:

$$z_j(t_i) = y_j(t_i) - A_3 e^{-k_3 t_i} \quad \text{Ecuación VII'-1}$$

donde  $y_j(t_i)$  es la medida del experimento  $j$  correspondiente al tiempo de incubación  $t_i$ ,  $z_j(t_i)$  es la misma medida luego de restarle el componente asociado a la fase de liberación residual, y  $A_3$  y  $k_3$  son parámetros de la Ecuación V-3, cuyo valor fue estimado al ajustar dicha ecuación a los resultados del experimento  $j$ . Las medidas resultantes ( $z_j$ ) son descriptas por la Función V-1. Esta transformación reduce la magnitud del cambio máximo observado (en un valor igual a  $A_3$ ) pero mantiene inalterados los parámetros que describen las primeras dos fases de liberación, así como el valor de  $Rb_{ocl}$  extrapolado a un tiempo de incubación infinito ( $Rb_{ocl,\infty}$ ).

En segundo lugar se procedió a normalizar el cambio máximo observado en todos los cursos en el tiempo de desoclusión obtenidos tanto en *presencia* como en *ausencia* de ATP, empleando la ecuación

$$z_{ij,norm} = f_j (z_{ij} - Rb_{ocl,\infty,j}) + Rb_{ocl,\infty,esp}$$

donde:

- 1)  $z_{ij}$  es la medida  $i$  del experimento  $j$  transformada según VII'-1,
- 2)  $z_{ij,norm}$  es la misma medida normalizada,
- 3)  $Rb_{ocl,\infty,j}$  es el valor del parámetro  $Rb_{ocl,\infty}$  obtenido por ajuste de la Ecuación V-1 o V-3, según corresponda, a los resultados originales del experimento  $j$ ,
- 4)  $Rb_{ocl,\infty,esp}$  es el valor de  $Rb_{ocl}$  que se esperaba obtener a tiempo infinito teniendo en cuenta la composición del medio de desoclusión, y
- 5)  $f_j$  es un factor de normalización propio del experimento  $j$ .

El factor  $f_j$  fue calculado como el cociente entre el cambio máximo esperado  $(Rb_{ocl,0} - Rb_{ocl,\infty})_{esp}$  y el observado  $(Rb_{ocl,0} - Rb_{ocl,\infty})_j$ :

$$f_j = \frac{(Rb_{ocl,0} - Rb_{ocl,\infty})_{esp}}{(Rb_{ocl,0} - Rb_{ocl,\infty})_j}$$

$Rb_{ocl,0,j}$  y  $Rb_{ocl,0,esp}$  corresponden a la cantidad de  $Rb^+$  ocluido a *tiempo cero* estimada a partir del ajuste de la Ecuación V-1 o V-3 a los datos experimentales, o esperada de acuerdo con la composición del medio de reacción, respectivamente.

## II. Estimación de los pesos estadísticos empleados en el proceso de regresión

En un proceso de ajuste mediante el método de cuadrados mínimos, el conjunto de parámetros que minimiza la suma de cuadrados de los residuos (SC) tendrá la máxima probabilidad de ser correcto si se cumple, entre otras condiciones, que la mencionada suma esté correctamente ponderada. Esto significa que el cuadrado de cada diferencia entre una medición ( $y_i$ ) y el valor correspondiente de la función ajustada ( $f_i$ ) se encuentra dividido por la varianza del error aleatorio de dicha medición ( $\sigma_i^2$ ). Al recíproco de la varianza del error aleatorio se lo denomina *peso estadístico* ( $w$ ).

Si el error aleatorio de cada medición  $y_i$  puede ser descrito por una variable aleatoria Normal de media cero y varianza  $\sigma_i^2$ , y las variables independientes están exentas de error, el producto entre la raíz cuadrada del peso estadístico y el error aleatorio (llamamos a este producto *error aleatorio ponderado*) presentará una distribución Normal de media cero y varianza unitaria. De esta manera, el error aleatorio ponderado asociado a cada medición tendrá una magnitud similar independientemente del error aleatorio que afecta las mediciones en las diferentes condiciones experimentales.

El error aleatorio puede ser estimado por la diferencia entre cada medición y el promedio de sus replicados ( $y_i - \bar{y}_i$ ) o por los errores residuales  $y_i - f_i$ , si la función ajustada es la adecuada. Entonces, cuando los pesos estadísticos han sido correctamente estimados, se cumplirá que el gráfico de las variables  $w^{1/2}(y - \bar{y})$  o  $w^{1/2}(y - f)$  en función de cualquier variable de análisis mostrará una serie de valores dispersos en una banda de ancho constante centrada en cero, con la mayor densidad de puntos próximos a este valor.

Para calcular el peso estadístico correspondiente a cada resultado experimental empleado en el ajuste del modelo de la Figura VII-2 llevamos a cabo el procedimiento que se describe a continuación.

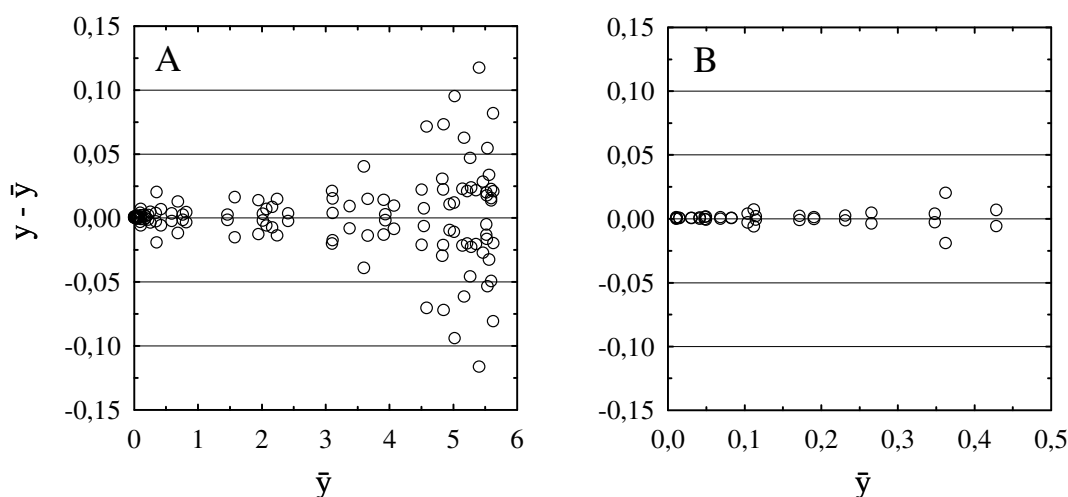
### 1) Estimación de la magnitud del error aleatorio de las medidas de $Rb_{ocl}$

La varianza del error aleatorio asociado a cada medición no puede conocerse con exactitud, sino que sólo puede ser *estimada*. En el caso de las medidas de  $Rb_{ocl}$  en el

*equilibrio*, en que se contaba con medidas replicadas para cada condición experimental (esto es, para cada combinación de concentraciones de  $\text{Rb}^+$  y de ATP), se calcularon las diferencias ( $y_i - \bar{y}_i$ ) para cada medida. Estas diferencias se muestran en los Paneles A y B de la Figura VII'-1, graficadas en función del promedio de cada serie de replicados.

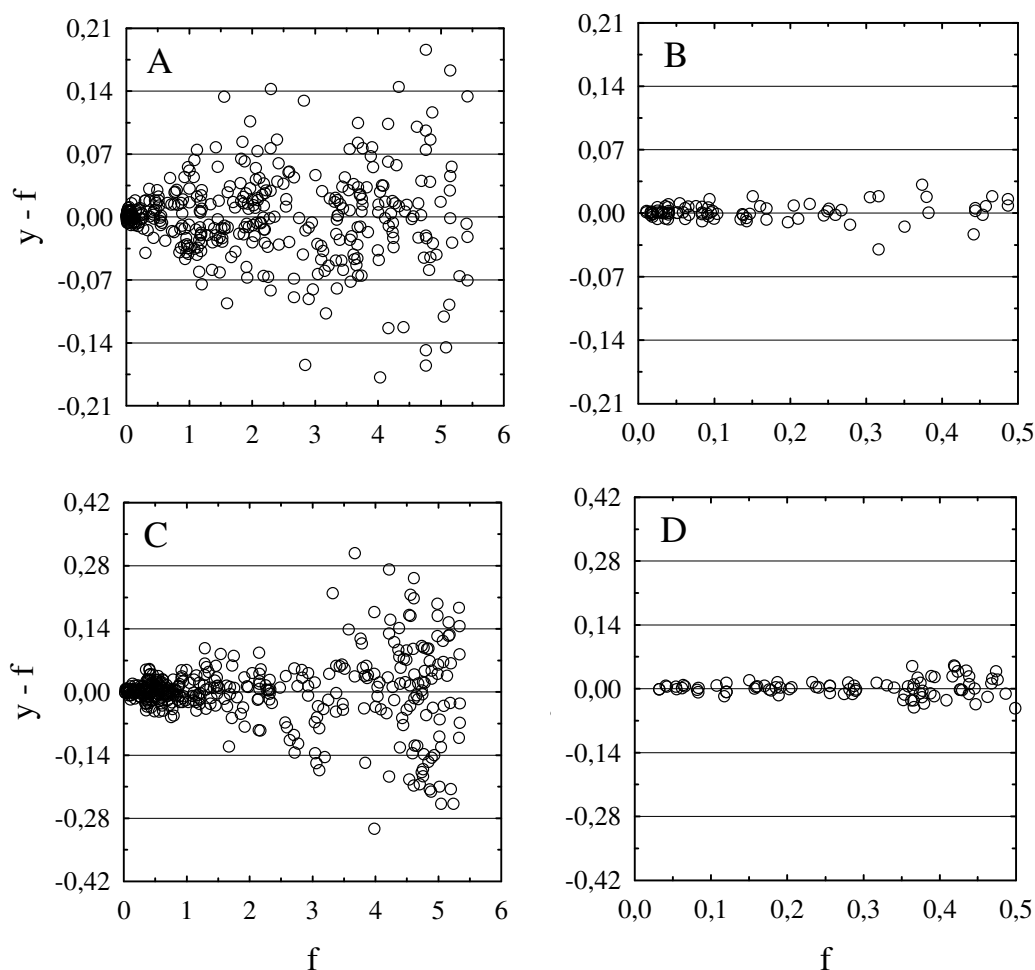
En el caso de experimentos donde se evaluó el *curso en el tiempo* de la oclusión o de la desoclusión de  $\text{Rb}^+$ , se calcularon las diferencias entre cada medida de cierto experimento ( $y_i$ ) y el correspondiente valor predicho por la ecuación empírica que proporcionó el mejor ajuste a ese experimento ( $f_i$ ). Esas diferencias se grafican en los Paneles A a D de la Figura VII'-2 en función de  $f_i$ .

Se advierte en las Figuras VII'-1 y VII'-2 que la varianza del error aleatorio aumenta al aumentar el valor de la señal.



**Figura VII'-1.** Estimación del error aleatorio en las determinaciones de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en equilibrio. Se grafica el valor de las diferencias entre medidas replicadas ( $y$ ) y el promedio de sus replicados ( $\bar{y}$ ), en función de  $\bar{y}$ . Los valores sobre los ejes están expresados en  $\text{nmol Rb}^+ / (\text{mg prot})$ . El Panel B muestra en mayor detalle las diferencias correspondientes a valores de abscisas hasta  $0,5 \text{ nmol Rb}^+ / (\text{mg prot})$ .





**Figura VII'-2.** Estimación del error aleatorio en las medidas del curso en el tiempo de la oclusión (A y B) o de la desocclusión de  $\text{Rb}^+$  (C y D). Se grafica el valor de las diferencias entre las medidas obtenidas en cada experimento ( $y$ ) y el correspondiente valor predicho por la ecuación empírica que proporcionó el mejor ajuste a ese experimento ( $f$ ), en función del valor predicho. En todos los paneles los valores sobre los ejes están expresados en  $\text{nmol Rb}^+ / (\text{mg prot})$ . Los Paneles B y D muestran en mayor detalle las diferencias correspondientes a valores de abscisas hasta 0,5  $\text{nmol Rb}^+ / (\text{mg prot})$ .

## 2) Estimación del factor de peso estadístico correspondiente a cada medida de $\text{Rb}_{ocl}$

Se supuso que en los tres tipos de experimentos (equilibrio, oclusión y desocclusión) la dependencia entre la varianza del error aleatorio y la variable del eje de abscisas (que llamaremos de manera general “ $z$ ”), podía ser descrita por la función empírica  $\sigma^2 = \beta \cdot z^\alpha$ , donde  $\alpha$  y  $\beta$  son constantes. Por lo tanto, los pesos estadísticos podían ser calculados con la siguiente *función de peso estadístico* ( $w$ ):

$$w = \frac{1}{\sigma^2} = \frac{1}{\beta \cdot z^\alpha} \quad \text{Ecuación VII'-2}$$

En primer lugar, el valor del factor  $\beta$  fue fijado en 1, y el valor del exponente  $\alpha$  fue optimizado de forma que se hiciera mínima la varianza del error aleatorio ponderado ( $\hat{\sigma}_{\text{eap}}^2$ ), calculada como:

$$\hat{\sigma}_{\text{eap}}^2 = \frac{\sum_i w_i (y_i - \bar{y}_i)^2}{gl} \quad \text{o} \quad \hat{\sigma}_{\text{eap}}^2 = \frac{\sum_i w_i (y_i - f_i)^2}{gl}$$

según el caso. En el denominador, “gl” indica el número de diferencias independientes que participan de la suma y es igual, en el primer caso, a la diferencia entre el número total de medidas replicadas y el número de promedios, y en el segundo, a la suma de las diferencias entre el número de medidas de cada experimento y el número de parámetros de la ecuación empírica ajustada a ese experimento.

Se obtuvieron de esta manera valores para  $\alpha$  de 1,71; 1,24 y 1,65, y para  $\hat{\sigma}_{\text{eap}}^2$  de  $2,06 \cdot 10^{-4}$ ;  $1,18 \cdot 10^{-3}$  y  $1,80 \cdot 10^{-3}$ , para las medidas de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el equilibrio, de oclusión y de desoclusión de  $\text{Rb}^+$ , respectivamente. Con estos valores de  $\alpha$ , las diferencias  $w_i^{1/2}(y_i - \bar{y}_i)$  o  $w_i^{1/2}(y_i - f_i)$  tomaron valores que se distribuían en una banda de ancho constante centrada en cero, con una varianza igual a  $\hat{\sigma}_{\text{eap}}^2$ .

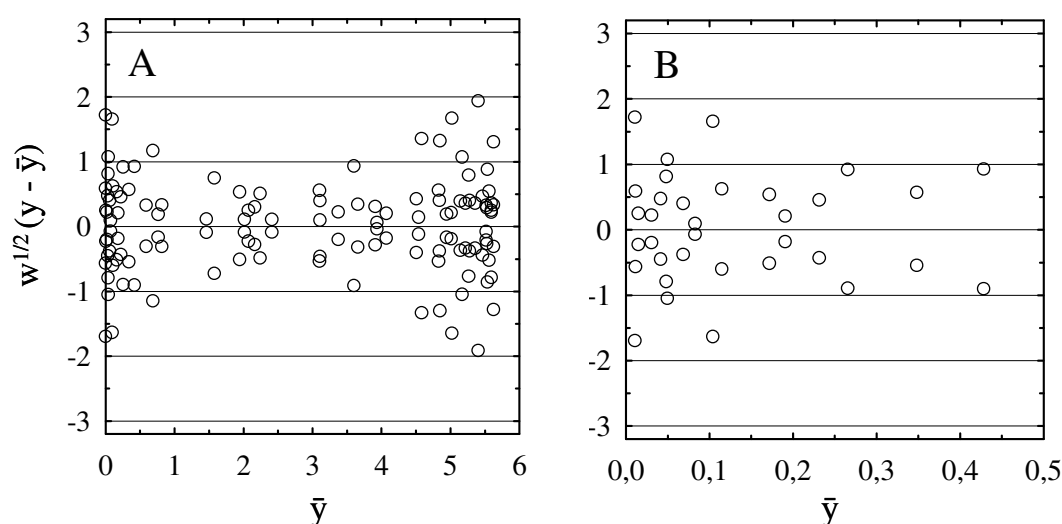
Una vez optimizado el valor de  $\alpha$ , era necesario para el ajuste *en conjunto* de las medidas provenientes de las tres clases de experimentos que  $\hat{\sigma}_{\text{eap}}^2$  en todos los casos fuera la misma. Para conseguir esto, en la función de peso estadístico (Ecuación VII'-2) se igualó el factor  $\beta$  al correspondiente valor de  $\hat{\sigma}_{\text{eap}}^2$  mencionado anteriormente. Al hacer esto, en todos los casos la varianza del error aleatorio ponderado se hizo igual a uno.

En conclusión, las funciones de peso estadístico empleadas tuvieron la forma que se indica abajo. La distribución de las diferencias  $w_i^{1/2}(y_i - \bar{y}_i)$  o  $w_i^{1/2}(y_i - f_i)$  se muestra en las Figuras VII'-3 y VII'-4.

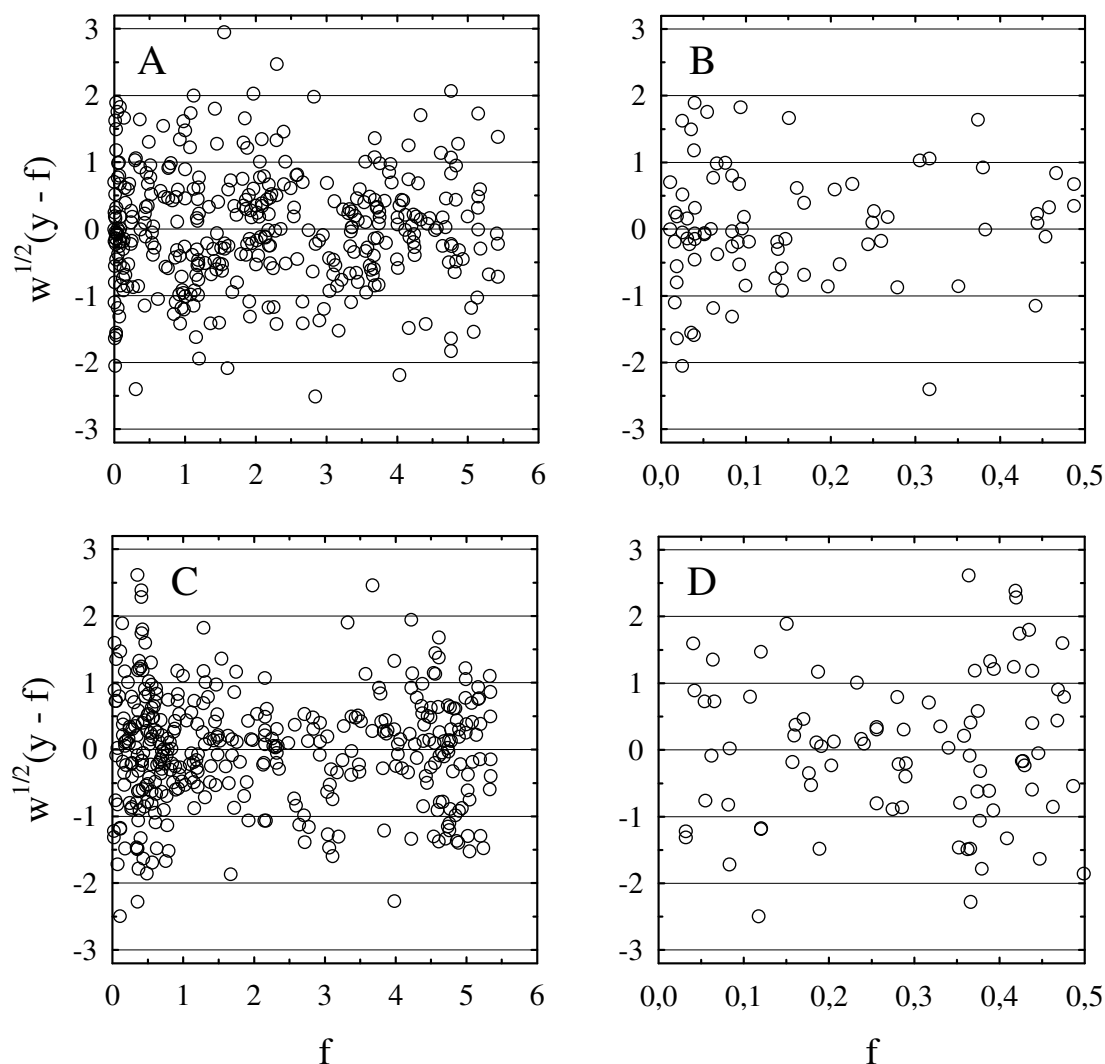
$$W_{\text{equilibrio}} = \frac{1}{2,06 \cdot 10^{-4} \cdot \bar{y}^{1,71}} \quad \text{Ecuación VII'-3}$$

$$W_{\text{oclusión}} = \frac{1}{1,18 \cdot 10^{-3} \cdot f^{1,24}} \quad \text{Ecuación VII'-4}$$

$$W_{\text{desoclusión}} = \frac{1}{1,80 \cdot 10^{-3} \cdot f^{1,65}} \quad \text{Ecuación VII'-5}$$



**Figura VII'-3.** Distribución del error aleatorio ponderado en las determinaciones de  $Rb_{\text{ocl}}$  en el equilibrio. Se grafican las diferencias mostradas en la Figura VII'-1 multiplicadas por la raíz cuadrada del correspondiente peso estadístico, que fue calculado empleando la Ecuación VII'-3. Los valores sobre el eje de abscisas están expresados en nmol  $Rb^+$ /(mg prot), mientras que los del eje de ordenadas carecen de unidades. El Panel B muestra en mayor detalle las diferencias correspondientes a valores de abscisas hasta 0,5 nmol  $Rb^+$ /(mg prot).



**Figura VII'-4.** Distribución del error aleatorio ponderado en las medidas del curso en el tiempo de la oclusión (A y B) o de la desoclusión de  $\text{Rb}^+$  (C y D). Se grafican las diferencias mostradas en la Figura VII'-2 multiplicadas por la raíz cuadrada del correspondiente peso estadístico, que fue calculado empleando las Ecuaciones VII'-4 (A y B) o VII'-5 (C y D). Los valores sobre el eje de abscisas están expresados en  $\text{nmol Rb}^+ / (\text{mg prot})$ , mientras que los del eje de ordenadas carecen de unidades. Los Paneles B y D muestran en mayor detalle las diferencias correspondientes a valores de abscisas hasta 0,5  $\text{nmol Rb}^+ / (\text{mg prot})$ .

En el procedimiento que hemos descripto para estimar la función de peso estadístico más adecuada, se emplearon los resultados experimentales *originales*, esto es, sin normalizar (ver sección anterior). Es claro que la varianza del error aleatorio asociado a la medida normalizada ( $\sigma_{\text{norm}}^2$ ) es distinta de la varianza del error asociado a la medida original ( $\sigma^2$ ). Para emplear la medida normalizada ( $y_{\text{norm}}$ ) en el proceso de ajuste debía

calcularse un peso estadístico diferente del correspondiente a la medida sin normalizar ( $y$ ). Este problema fue resuelto deduciendo la relación entre  $\sigma_{\text{norm}}^2$  y  $\sigma^2$  empleando la siguiente transformación (Di Cera, 1992):

$$\sigma_{\text{norm}}^2 = \left( \frac{\partial y_{\text{norm}}}{\partial y} \right)^2 \sigma^2$$

y calculando el nuevo peso estadístico a partir de  $\sigma_{\text{norm}}^2$  considerando la definición de peso estadístico dada anteriormente:

$$w = \frac{1}{\sigma_{\text{norm}}^2}$$

---

# CAPÍTULO VIII

## *Conclusiones*

Para explicar la manera en que el ATP, actuando como modulador, modifica la interacción entre la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y el  $\text{Rb}^+$ , se estudió la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico, así como el curso en el tiempo del incremento de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido a través de la ruta directa y de la liberación de  $\text{Rb}^+$  ocluido, empleando medios de reacción con diferentes concentraciones de este catión y de ATP. Los resultados más relevantes de dicho estudio fueron mostrados y discutidos a lo largo de esta tesis, y sus conclusiones se enumeran a continuación.

### *Cantidad de $\text{Rb}^+$ ocluido en condiciones de equilibrio termodinámico*

1) Para una dada concentración de  $\text{Rb}^+$  en el medio de incubación, incrementos en la concentración de ATP conducen a una disminución hiperbólica de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  hasta valores mayores a cero. La constante aparente de disociación del ATP es tanto mayor cuanto mayor es la concentración de  $\text{Rb}^+$  empleada, y los valores extrapolados para una concentración de  $\text{Rb}^+$  igual a cero o que tiende a infinito son similares a los publicados para la constante de disociación del ATP del sitio catalítico o regulatorio, respectivamente.

2) En medios de reacción libres de ATP, la dependencia de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  respecto de la concentración de  $\text{Rb}^+$  es adecuadamente descrito por una función hiperbólica con un valor de  $K_{0,5}$  igual a  $5,80 \pm 0,39 \mu\text{M}$ . La cantidad máxima de  $\text{Rb}^+$  ocluido medida es compatible con una estequiometría de dos moles de  $\text{Rb}^+$  ocluidos por mol de enzima

activa, por lo que el comportamiento hiperbólico puede ser explicado suponiendo que los dos sitios de oclusión se comportan como si fueran idénticos y no interactuantes.

3) En presencia de ATP, las curvas de  $Rb_{ocl}$  versus  $[Rb^+]$  aumentan en forma sigmoide, con valores de  $K_{0,5}$  superiores al obtenido en ausencia del nucleótido. Los valores de  $K_{0,5}$  aumentan de forma saturable con la concentración de ATP, evidenciando una menor afinidad aparente por el catión. La capacidad de oclusión de la enzima, en cambio, no se ve modificada por el ATP, obteniéndose una cantidad máxima de  $Rb^+$  ocluido similar a la observada en medios de reacción donde el nucleótido está ausente.

4) Tanto en presencia como en ausencia del nucleótido existen estados de la enzima con un solo  $Rb^+$  ocluido. Por lo tanto, la forma sigmoide de la curva de  $Rb_{ocl}$  versus  $[Rb^+]$  responde a que, en presencia de ATP, los sitios de oclusión ya no se comportan como idénticos y no interactuantes.

5) Los resultados experimentales pueden ser explicados empleando un modelo que supone (1) que la  $Na^+/K^+$ -ATPasa puede unir y ocluir uno o dos iones  $Rb^+$ , (2) que la enzima une sólo una molécula de ATP, ya sea que esté unida o no a  $Rb^+$ , y (3) que todo el  $Rb^+$  unido a la enzima se encuentra ocluido.

### ***Curso en el tiempo de la oclusión de $Rb^+$***

1) Tanto en ausencia como en presencia de ATP,  $Rb_{ocl}$  aumenta con el tiempo de forma predominantemente bifásica hasta alcanzar un valor de equilibrio que se incrementa con la concentración de  $Rb^+$  en el medio de incubación. Existe a su vez una fase inicial de oclusión muy rápida y de pequeña amplitud, cuya velocidad es menor en presencia de ATP. La amplitud de esta fase aumenta con la concentración de  $Rb^+$  (con baja afinidad aparente, ya sea que el medio de reacción contenga o no ATP) y disminuye en presencia del nucleótido (permitiendo calcular una constante de disociación aparente para el ATP cercana a 1  $\mu M$ ).

2) Los resultados experimentales obtenidos en ausencia de ATP pueden ser adecuadamente ajustados por la suma de dos funciones exponenciales crecientes y un término independiente del tiempo. En presencia de ATP, es necesario incluir un término exponencial adicional para describir la pequeña fase inicial muy rápida. Al comparar las dos fases mayoritarias, se observa que tanto en presencia como en ausencia del nucleótido la amplitud de la primera ( $A_1$ ) es superior a la de la segunda ( $A_2$ ).

3) La amplitud de la fase rápida de oclusión ( $A_1$ ) aumenta al aumentar la concentración de  $\text{Rb}^+$  en medios de reacción con o sin ATP, siendo posible observar una disminución en la afinidad aparente por el catión inducida por el ATP. La amplitud  $A_2$  aumentó con la concentración de  $\text{Rb}^+$  en presencia de ATP, mientras que en su ausencia aumentó (hasta  $7 \mu\text{M Rb}^+$ ) y luego decreció.

4) El coeficiente de velocidad de la primera fase ( $k_1$ ) aumenta linealmente con la concentración de  $\text{Rb}^+$  y muestra valores similares en medios de reacción libres de ATP y en aquéllos conteniendo  $200 \mu\text{M ATP}$ . El coeficiente de velocidad de la segunda ( $k_2$ ) no parece variar con la concentración de  $\text{Rb}^+$  en ausencia de ATP, en tanto que en presencia de  $200 \mu\text{M ATP}$ , aumenta marcadamente ante incrementos de la concentración del catión.

5) La variación de la velocidad de oclusión para tiempos próximos a cero, frente a cambios en las concentraciones de  $\text{Rb}^+$  y de ATP, sugiere que en los instantes iniciales del proceso de oclusión debe ser posible la formación de estados con un único  $\text{Rb}^+$  ocluido, y que, al menos en presencia de ATP, la oclusión de uno o dos  $\text{Rb}^+$  puede ocurrir más o menos simultáneamente.

6) Incrementos en la concentración de ATP conducen a una disminución o a un incremento hiperbólico de la velocidad de oclusión, según la concentración de  $\text{Rb}^+$  empleada sea menor o mayor que  $500 \mu\text{M}$ , respectivamente. El ATP induce estos cambios con una afinidad aparente similar para todas las concentraciones de  $\text{Rb}^+$ , y comparable a la afinidad aparente del nucleótido por la enzima libre.



7) El ATP no parece inducir una modificación en la afinidad intrínseca de los sitios de unión/oclusión por el  $\text{Rb}^+$ .

### ***Curso en el tiempo de la desoclusión de $\text{Rb}^+$***

1) En medios de reacción libres de ATP, la desoclusión de  $\text{Rb}^+$  tiene lugar en dos fases de amplitudes similares. El carácter bifásico del proceso es más evidente cuanto mayor es la concentración de  $\text{Rb}^+$  en el medio de incubación.

2) La suma de dos funciones exponenciales decrecientes con amplitudes iguales y un término independiente del tiempo es la que provee el mejor ajuste a estos resultados. Los coeficientes de velocidad de ambas fases decrecen hiperbólicamente con la concentración de  $\text{Rb}^+$ , y tienden a valores mayores a cero cuando la concentración de  $\text{Rb}^+$  tiende a infinito. Los valores de  $K_{0,5}$  de estas funciones son similares entre sí, y similares al valor de  $K_{0,5}$  de la hipérbola que relaciona  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  en el equilibrio con la concentración de  $\text{Rb}^+$ , por lo que estos efectos dependerían de la interacción con los mismos sitios.

3) Sobre la base de trabajos previos, la disminución de los valores de  $k_2$  puede ser explicada suponiendo que los sitios de oclusión se disponen en “fila india”, lo que impone un orden en la liberación de los iones ocluidos, y que, una vez liberado el primer ión, la liberación del segundo puede ser “bloqueada” por la oclusión de  $\text{Rb}^+$  del medio de incubación en el sitio del ión liberado.

4) La liberación del  $\text{Rb}^+$  ocluido es promovida por el ATP y tiene lugar principalmente en dos fases, aunque existe una tercera fase residual muy lenta y de pequeña amplitud que no pudo ser correctamente caracterizada. Esta última fase no correspondería al lento eflujo de  $\text{Rb}^+$  del interior de vesículas remanentes en la preparación de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa ya que sus características no se vieron modificadas por la presencia de alameticina, un péptido formador de poros transmembrana.

5) La aceleración de la desoclusión de  $\text{Rb}^+$  promovida por el ATP se refleja en el incremento de la velocidad inicial de desoclusión y de los coeficientes de velocidad de las dos fases principales respecto de los observados en medios de reacción libres de ATP. El ATP ejerce este efecto con una afinidad comparable a la que muestra por las formas de la enzima con  $\text{Rb}^+$  ocluido.

6) El ajuste de una función compuesta por la suma de tres exponenciales decrecientes y un término independiente muestra que, en presencia de 2 mM ATP, la amplitud de las primeras dos fases es independiente de la concentración de  $\text{Rb}^+$  empleada, siendo la amplitud de la fase rápida aproximadamente 5 veces superior a la de la fase lenta.

7) El ATP elimina la inhibición de la desoclusión de  $\text{Rb}^+$  por el  $\text{Rb}^+$  presente en el medio de incubación. Esto fue confirmado al mostrar que la liberación de  $^{86}\text{Rb}^+$  localizado selectivamente en uno u otro de los sitios de oclusión da lugar a curvas de desoclusión prácticamente superponibles.

### ***Modelado de la interacción entre la $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, el $\text{Rb}^+$ y el ATP***

1) Se modeló la interacción entre la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa, el  $\text{Rb}^+$  y el ATP formulando un modelo que supone que, tanto en presencia como en ausencia de ATP, la oclusión de  $\text{Rb}^+$  puede seguir dos caminos alternativos: uno que implica la unión del catión a la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa en conformación  $E_1$  (a sitios expuestos hacia el lado que correspondería a la región intracelular de la proteína) y el posterior cambio conformacional  $E_1 \rightarrow E_2$ , y otro que involucra la unión y oclusión por la especie  $E_2$  (en sitios expuestos del lado “extracelular” de la enzima). A su vez, el modelo supone que la enzima que se encuentra en conformación  $E_1$  puede exponer simultáneamente ambos sitios de unión a  $\text{Rb}^+$ , mientras que, en la conformación  $E_2$ , sólo uno de los sitios puede ser expuesto al medio de incubación y la oclusión o desoclusión de  $\text{Rb}^+$  es secuencial y ordenada. Este modelo describió adecuadamente las variaciones de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en el equilibrio, y el curso en el tiempo de la oclusión y desoclusión de  $\text{Rb}^+$ , en medios de incubación con diferentes concentraciones de  $\text{Rb}^+$  y de ATP.

2) El modelo permite describir el mecanismo por el cual el  $\text{Rb}^+$  es ocluido cuando el proceso ocurre a través de la ruta directa. Los ajustes sugieren que la unión de  $\text{Rb}^+$  a sitios de baja afinidad en  $E_1$  contribuye de manera significativa a la formación de especies con  $\text{Rb}^+$  ocluido, tanto en ausencia como en presencia de ATP. Si bien el cambio conformacional  $E_1 \rightarrow E_2$  está menos favorecido en el segundo caso que en el primero, se verifica que el equilibrio entre conformaciones está marcadamente desplazado hacia las formas con  $\text{Rb}^+$  ocluido independientemente de la presencia de ATP.

3) La desoclusión de  $\text{Rb}^+$  ocurriría, en ausencia de ATP, predominantemente hacia el lado extracelular de la enzima y de manera secuencial y ordenada, en concordancia con la evidencia experimental previa. La unión de ATP eliminaría esa secuencialidad, posiblemente al favorecer la transición  $E_2 \rightarrow E_1$  y la liberación de  $\text{Rb}^+$  desde sitios expuestos simultáneamente al medio de reacción del lado intracelular.

4) Si bien en algunos casos el modelo no logra reproducir cuantitativamente los resultados experimentales, sí predice valores de  $\text{Rb}_{\text{ocl}}$  cuya evolución muestra la misma forma que las curvas observadas experimentalmente. Teniendo esto en cuenta, sería razonable pensar que las diferencias cuantitativas encontradas están más relacionadas con el hecho de que no se obtuvo el mejor ajuste posible a la información empírica, más que con problemas inherentes a la formulación del modelo.

---

## *Resumen*

La  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa es una enzima multimérica integral de la membrana plasmática de células animales. Su función es catalizar el transporte activo de tres iones  $\text{Na}^+$  desde el citoplasma hacia el medio extracelular y de dos iones  $\text{K}^+$  en sentido inverso, empleando la energía proveniente de la hidrólisis de una molécula de ATP. Como consecuencia de su actividad, la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa juega un papel esencial en la homeostasis celular y diversos procesos de transporte.

Durante su funcionamiento la enzima alterna entre dos conformaciones ( $E_1$  y  $E_2$ ) que exponen sitios de unión hacia los lados intracelular y extracelular de la membrana, respectivamente, y que difieren en su afinidad por el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{K}^+$ . El transporte de los iones requiere que en algún momento éstos se encuentren “ocluídos”, es decir, que sean inaccesibles desde ambos lados de la membrana. La liberación del  $\text{K}^+$  ocluido en  $E_2$  es el paso limitante del ciclo de reacciones, y es acelerada marcadamente por la unión de ATP a un sitio de baja afinidad, sin ser hidrolizado.

La acción moduladora del ATP sobre la desoclusión de  $\text{K}^+$  ha sido extensamente estudiada, aunque en condiciones experimentales dispares. Por otro lado, se cuenta con información escasa y contradictoria sobre el efecto del nucleótido sobre la reacción inversa, que conduce a la oclusión de  $\text{K}^+$  a través de la llamada *ruta directa*, ya que la elevada velocidad de las reacciones involucradas limita el espectro de técnicas aplicables a su estudio. Como consecuencia, no se han propuesto modelos cinéticos detallados que expliquen de forma integral cómo el ATP ejerce sus efectos modulatorios, y que contribuyan a describir los pasos involucrados en el transporte de  $\text{K}^+$  en presencia del nucleótido.

Con el objeto de resolver esa falencia, en este trabajo nos hemos propuesto caracterizar cinéticamente tanto la desoclusión de  $\text{Rb}^+$  (un congénere del  $\text{K}^+$ ) como su oclusión a través de la ruta directa, en un amplio intervalo de concentraciones de  $\text{Rb}^+$  y de ATP. Para ello se empleó una técnica desarrollada en nuestro laboratorio que permite el estudio de reacciones en el rango de los milisegundos. Los experimentos mencionados

se complementaron con el análisis de las modificaciones que el ATP induce en la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido en condiciones de equilibrio.

Los resultados mostraron que el ATP cambia de hiperbólica a sigmoide la curva de  $\text{Rb}^+$  ocluido en el equilibrio *versus*  $[\text{Rb}^+]$ , induciendo a su vez una disminución de la afinidad aparente por el catión sin alterar la capacidad de oclusión de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa. La cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido extrapolada a una concentración infinita del catión correspondió a 2 moles de  $\text{Rb}^+$  por mol de enzima activa independientemente de la concentración de ATP.

Las curvas de incremento en el tiempo de la cantidad de  $\text{Rb}^+$  ocluido, tanto en presencia de ATP como en su ausencia, presentaron dos fases mayoritarias y alcanzaron un valor de equilibrio en aproximadamente un minuto. De dichas fases, la más rápida fue la de mayor amplitud, siendo esto más marcado en medios de reacción con ATP, y estuvo asociada a la oclusión de más de un  $\text{Rb}^+$ . El nucleótido produjo una disminución o un aumento de la velocidad *inicial* de oclusión cuando la concentración de  $\text{Rb}^+$  fue menor o mayor que 500  $\mu\text{M}$ , respectivamente. No obstante, en todos los casos la velocidad de la segunda fase de oclusión fue mayor en presencia de ATP.

La desocclusión de  $\text{Rb}^+$  en ausencia de ATP se produjo a lo largo de curvas bifásicas de amplitudes similares, compatibles con una liberación secuencial y ordenada de los cationes. El ATP hizo que se perdiera esa secuencialidad y que ambos cationes fueran liberados rápidamente, independientemente del sitio de oclusión que ocupaban.

Se consiguió una adecuada descripción de la información experimental con un modelo que propone que la oclusión del  $\text{Rb}^+$  puede ocurrir desde accesos intra o extracelulares. En el primer caso la unión a los sitios ocurre *al azar*, mientras que en el segundo es *secuencial y ordenada* existiendo un paso lento entre la unión de ambos cationes. La unión de ATP a la enzima promueve el cambio conformacional  $E_2 \rightarrow E_1$ , desfavoreciendo la oclusión y favoreciendo la desocclusión de  $\text{Rb}^+$ .

---

## *Referencias bibliográficas*

Albers, R. W.; Fahn, S. y Koval, G. J. (1963). “The role of sodium ions in the activation of *Electrophorus* electric organ adenosine triphosphatase.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **50**: 474 – 481.

Baginski, E. S.; Foa, P. P. y Zak, B. (1967). “Determination of phosphate: Study of labile organic phosphate interference.” *Clin. Chim. Acta* **15**: 155 – 158.

Beaugé, L. (1978). “Activation by lithium ions of the inside sodium sites in (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase.” *Biochim. Biophys. Acta* **527**: 472 – 484.

Beaugé, L. A. y Glynn, I. M. (1979). “Occlusion of K ions in the unphosphorylated sodium pump.” *Nature* **280**: 510 – 512.

Burnham, K. P. y Anderson, D. R. (2002). *Model Selection and Multimodel Inference*, 2da. edición, pp. 60 – 85, Springer, New York.

Caldwell, P. C. y Keynes, R. D. (1957). “The utilization of phosphate bond energy for sodium extrusion.” *J. Physiol.* **137**: 12 – 13P.

Castillo, J. P.; De Giorgis, D.; Basilio, D.; Gadsby, D. C.; Rosenthal, J. J. C.; Latorre, R., Holmgren, M. y Bezanilla, F. (2011). “Energy landscape of the reactions governing the Na<sup>+</sup> deeply occluded state of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the giant axon of the Humboldt squid.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**: 20556 – 20561.

Cornelius, F. (1996). “The Sodium Pump.” En: *Biomembranes. ATPases*. (Vol. 5) (Lee, A. G.; ed.), pp. 133 – 184, JAI Press Inc., Greenwich.

Di Cera, E. (1992). “Use of Weighting Functions in Data Fitting.” *Meth. Enzymol.* **210**: 68 – 87.

Dunham, E. T. y Glynn, I. M. (1961). “Adenosinetriphosphatase activity and the active movements of alkali metal ions.” *J. Physiol.* **156**: 274 – 293.

Einholm, A. P.; Toustrup-Jensen, M. S.; Holm, R.; Andersen, J. P. y Vilsen, B. (2010). "The Rapid-Onset Dystonia Parkinsonism Mutation D923N of the Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha_3$  Isoform Disrupts Na<sup>+</sup> Interaction at the Third Na<sup>+</sup> Site." *J. Biol. Chem.* **285**: 26245 – 26254.

Esmann, M. (1988). "ATPase and Phosphatase Activity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase: Molar and Specific Activity, Protein Determination." *Meth. Enzymol.* **156**: 107 – 108.

Esmann, M. (1992). "Determination of rate constants for nucleotide dissociation from Na,K-ATPase." *Biochim. Biophys. Acta* **1110**: 20 – 28.

Esmann, M. (1994). "Influence of Na<sup>+</sup> on Conformational States in Membrane-Bound Renal Na,K-ATPase." *Biochem.* **33**: 8558 – 8565.

Fenn, W. O. y Cobb, D. M. (1936). "Electrolyte changes in muscle during activity." *Am. J. Physiol.* **115**: 345 – 356.

Ferreira-Gomes, M. S.; González-Lebrero, R. M.; de la Fuente, M. C.; Strehler, E. E.; Rossi, R. C. y Rossi, J. P. F. C. (2011). "Calcium Occlusion in Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase." *J. Biol. Chem.* **286**: 32018 – 32025.

Forbush, B. (1984) "An Apparatus for Rapid Kinetic Analysis of Isotope Efflux from Membrane Vesicles and of Ligand Dissociation from Membrane Proteins." *Anal. Biochem.* **140**: 495 – 505.

Forbush, B. (1985). "Rapid ion movements in a single turnover of the Na<sup>+</sup> pump." En: *The Sodium Pump* (Glynn, I. M. y Ellory, C.; eds.), pp. 599 – 611, The Company of Biologists Limited, Cambridge.

Forbush, B. (1987a). "Rapid Release of <sup>42</sup>K and <sup>86</sup>Rb from an Occluded State of the Na,K-Pump in the Presence of ATP or ADP." *J. Biol. Chem.* **262**: 11104 – 11115.

Forbush, B. (1987b). "Rapid Release of <sup>42</sup>K and <sup>86</sup>Rb from Two Distinct Transport Sites on the Na,K-Pump in the Presence of P<sub>i</sub> or Vanadate." *J. Biol. Chem.* **262**: 11116 – 11127.

Forbush, B. (1988). "Occluded ions in Na,K-ATPase." En: *The Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-Pump. Part A: Molecular Aspects* (Skou, J. C., Nørby, J. G., Maunsbach, A. B. y Esmann, M.; eds.), pp. 229 – 248, Alan R. Liss Inc., New York.

Fraser, R. D. B. y Suzuki, E. (1973). En: *Physical principles and techniques of protein chemistry* (part C) (Leach, S. J.; ed.), pp. 301 – 305, Academic Press, New York.

Gárdos, G. (1954). “Akkumulation der Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen.” *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **6**: 191 – 199.

Geering, K. (2001). “The functional role of  $\beta$  subunits in oligomeric P-type ATPases.” *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**: 425 – 438.

Geering, K. (2006). “FXYP proteins: new regulators of Na-K-ATPase.” *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **290**: F241 – 250.

Glynn, I. M. (1956). “Sodium and potassium movements in human red cells.” *J. Physiol.* **134**: 278 – 310.

Glynn, I. M. (1957). “The action of cardiac glycosides on sodium and potassium movements in human red cells.” *J. Physiol.* **136**: 148 – 73.

Glynn, I. M. (1961). “Activation of adenosinetriphosphatase activity in a cell membrane by external potassium and internal sodium.” *J. Physiol.* **160**: 18 – 19P.

Glynn, I. M. (2002). “A Hundred Years of Sodium Pumping.” *Annu. Rev. Physiol.* **64**: 1 – 18.

Glynn, I. M. y Richards, D. E. (1982). “Occlusion of rubidium ions by the sodium-potassium pump: its implications for the mechanism of potassium transport.” *J. Physiol.* **330**: 17 – 43.

Glynn, I. M.; Hara, Y. y Richards, D. E. (1984). “The occlusion of sodium ions within the mammalian sodium-potassium pump: its role in sodium transport.” *J. Physiol.* **351**: 531 – 547.

Glynn, I. M.; Hara, Y.; Richards, D. E. y Steinberg, M. (1987). “Comparison of rates of cation release and of conformational change in dog kidney Na,K-ATPase.” *J. Physiol.* **383**: 477 – 485.



Glynn, I. M.; Howland, J. L. y Richards, D. E. (1985). "Evidence for the ordered release of rubidium ions occluded within the Na,K-ATPase of mammalian kidney." *J. Physiol.* **368**: 453 – 469.

González-Lebrero, R. M. (2001). "Caracterización cinética del fenómeno de oclusión de K<sup>+</sup> en la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa." Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.

González-Lebrero, R. M.; Kaufman, S. B.; Montes, M. R.; Nørby, J. G.; Garrahan, P. J. y Rossi, R. C. (2002a). "The Occlusion of Rb<sup>+</sup> in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. I. The identity of occluded states formed by the physiological or the direct routes: occlusion/deocclusion kinetics through the direct route." *J. Biol. Chem.* **277**: 5910 – 5921.

González-Lebrero, R. M.; Kaufman, S. B.; Garrahan, P. J. y Rossi, R. C. (2002b). "The Occlusion of Rb<sup>+</sup> in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. II. The effects of Rb<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> or ATP on the equilibrium between free and occluded Rb<sup>+</sup>." *J. Biol. Chem.* **277**: 5922 – 5928.

Hammes, G. G. y Schimmel, P. R. (1970). En: *The Enzymes* (Boyer, P. D.; ed.), 3ra. edición, vol. 2, pp. 67 – 114, Academic, New York.

Hasenauer, J.; Huang, W-H. y Askari, A. (1993). "Allosteric Regulation of the Access Channels to the Rb<sup>+</sup> Occlusion Sites of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase." *J. Biol. Chem.* **268**: 3289 – 3297.

Hegyvary, C. y Port, R. L. (1971). "Binding of adenosine triphosphate to sodium and potassium ion-stimulated adenosine triphosphatase." *J. Biol. Chem.* **249**: 5234 – 5240.

Hodgkin, A. L. y Keynes, R. D. (1955). "Active transport of cations in giant axons from *Sepia* and *Loligo*." *J. Physiol.* **128**: 28 – 60.

Holmgren, M.; Wagg, J.; Bezanilla, F.; Rakowski, R. F.; De Weer, P. y Gadsby, D. C. (2000). "Three distinct and sequential steps in the release of sodium ions by the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase." *Nature* **403**: 898 – 901.

Hoops, S.; Sahle, S.; Gauges, R.; Lee, C.; Pahle, J.; Simus, N.; Singhal, N.; Xu, L.; Mendes, P. y Kummer, U. (2006). "COPASI –a COMplex PATHway SIMulator." *Bioinformatics* **22**: 3067 – 3074.

Inesi, G. (1987). "Characterization of partial reactions in the catalytic and transport cycle of sarcoplasmic reticulum ATPase." *J. Biol. Chem.* **262**: 16338 – 16342.

IUPAC (preparado para publicación por Smith, R. M.; Martell, A. E. y Chen, Y.) (1991). "Critical Evaluation of Stability Constants for Nucleotide Complexes with Protons and Metal Ions and the Accompanying Enthalpy Changes." *Pure & Appl. Chem.* **63**: 1015 – 1080.

Jensen, A. M.; Sørensen, T. L.; Olesen, C.; Møller, J. V. y Nissen, P. (2006). "Modulatory and catalytic modes of ATP binding by the calcium pump." *EMBO J.* **25**: 2305 – 2314.

Jensen, J. y Nørby, J. G. (1989). "Thallium binding to native and radiation-inactivated Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase." *Biochim. Biophys. Acta* **985**: 248 – 254.

Jensen, J.; Nørby, J. G. y Ottolenghi, P. (1984). "Binding of sodium and potassium to the sodium pump of pig kidney evaluated from nucleotide-binding behaviour." *J. Physiol.* **346**: 219 – 241.

Johnson, M. L. y Frasier, S. G. (1985). "Nonlinear least-squares analysis." *Meth. Enzymol.* **117**: 301 – 342.

Jørgensen, P. L. (1975). "Purification and characterization of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. V. Conformational changes in the enzyme. Transitions between the Na-form and K-form studied with tryptic digestion as a tool." *Biochim. Biophys. Acta* **401**: 399 – 415.

Jørgensen, P. L. (1977). "Purification and characterization of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase. VI. Differential tryptic modification of catalytic functions of the purified enzyme in the presence of NaCl and KCl." *Biochim. Biophys. Acta* **466**: 97 – 108.

Kanai, R.; Ogawa, H.; Vilsen, B.; Cornelius, F. y Toyoshima, C. (2013). "Crystal structure of a Na<sup>+</sup>-bound Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase preceding the E1P state." *Nature* **502**: 201 – 206.

Karlish, S. J. D. y Pick, U. (1981). "Sidedness of the effects of sodium and potassium ions on the conformational state of the sodium-potassium pump." *J. Physiol.* **312**: 505 – 529.

Karlish, S. J. D. y Stein, W. D. (1982). "Passive rubidium fluxes mediated by Na-K-ATPase reconstituted into phospholipid vesicles when ATP- and phosphate-free." *J. Physiol.* **328**: 295 – 316.

Karlish, S. J. D. y Yates, D. W. (1978). "Tryptophan fluorescence of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase as a tool for study of the enzyme mechanism." *Biochim. Biophys. Acta* **527**: 115 – 130.

Karlish, S. J. D.; Yates, D. W. y Glynn, I. M. (1978a). "Elementary steps of the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase mechanism, studied with formycin nucleotides." *Biochim. Biophys. Acta* **525**: 230 – 251.

Karlish, S. J. D.; Yates, D. W. y Glynn, I. M. (1978b). "Conformational transitions between Na<sup>+</sup>-bound and K<sup>+</sup>-bound forms of (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase, studied with formycin nucleotides." *Biochim. Biophys. Acta* **525**: 252 – 264.

Kaufman, S. B.; González-Flecha, F. L. y González-Lebrero, R. M. (2012). "Opposing Effects of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> on the Thermal Stability of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase." *J. Phys. Chem. B* **116**: 3421 – 3429.

Kaufman, S. B.; González-Lebrero, R. M.; Rossi, R. C. y Garrahan, P. J. (2006). "Binding of a Single Rb<sup>+</sup> Increases Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, Activating Dephosphorylation without Stoichiometric Occlusion." *J. Biol. Chem.* **281**: 15721 – 15726.

Kaufman, S. B.; González-Lebrero, R. M.; Schwarzbaum, P. J.; Nørby, J. G.; Garrahan, P. J. y Rossi, R. C. (1999). "Are the States that Occlude Rubidium Obligatory Intermediates of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase Reaction?" *J. Biol. Chem.* **274**: 20779 – 20790.

Lingrel, J. B. (2010). "The physiological significance of the cardiotonic steroid/ouabain-binding site of the Na,K-ATPase." *Annu. Rev. Physiol.* **72**: 395 – 412.

Lutsenko, S. y Kaplan, J. H. (1993). "An essential role for the extracellular domain of the Na,K-ATPase  $\beta$ -subunit in cation occlusion." *Biochem.* **32**: 6737 – 6743.

Maizels, M. (1954). "Active cation transport in erythrocytes." *Symp. Soc. Exp. Biol.* **8**: 202 – 227.

Montes, M. R.; González-Lebrero, R. M.; Garrahan, P. J. y Rossi, R. C. (2004). "Quantitative Analysis of the Interaction Between the Fluorescent Probe Eosin and the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase Studied through  $\text{Rb}^+$  Occlusion." *Biochem.* **43**: 2062 – 2069.

Montes, M. R.; González-Lebrero, R. M.; Garrahan, P. J. y Rossi, R. C. (2006). "Eosin Fluorescence Changes during  $\text{Rb}^+$  Occlusion in the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase." *Biochem.* **45**: 2062 – 2069.

Montes, M. R.; Monti, J. L. E. y Rossi, R. C. (2012). " $E2 \rightarrow E1$  transition and  $\text{Rb}^+$  release induced by  $\text{Na}^+$  in the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase. Vanadate as a tool to investigate the interaction between  $\text{Rb}^+$  and  $E2$ ." *Biochim. Biophys. Acta (Biomem.)* **1818**: 2087 – 2093.

Montes, M. R.; Spiaggi, A. J.; Monti, J. L. E.; Cornelius, F.; Olesen, C.; Garrahan, P. J. y Rossi, R. C. (2011). " $\text{Rb}^+$  occlusion stabilized by vanadate in  $\text{H}^+/\text{K}^+$ -ATPase vesicles at 25 °C." *Biochim. Biophys. Acta (Biomem.)* **1808**: 316 – 322.

Monti, J. L. E. (2010). "Interacción entre la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasa y los cationes que transporta." Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires.

Morth, J. P.; Pedersen, B. P.; Toustrup-Jensen, M. S.; Sørensen, T. L.; Petersen, J.; Andersen, J. P.; Vilsen, B. y Nissen, P. (2007). "Crystal structure of the sodium-potassium pump." *Nature* **450**: 1043 – 1049.

Nørby, J. G. y Jensen, J. (1971). "Binding of ATP to brain microsomal ATPase. Determination of ATP-binding capacity and the dissociation constant of the enzyme-ATP complex as a function of  $\text{K}^+$  concentration." *Biochim. Biophys. Acta* **233**: 104 – 116.

Overton, E. (1902). "Beiträge zur allgemeinen Muskel- und Nerven-Physiologie. II. Über die Unentbehrlichkeit von Natrium- (oder Lithium-) Ionen für den Contractionsact des Muskels." *Pflügers Arch.* **92**: 346 – 386.

Palmgren, M. G. y Nissen, P. (2011). "P-Type ATPases." *Annu. Rev. Biophys.* **40**: 243 – 266.

Post, R. L. y Jolly, P. C. (1957). "The linkage of sodium, potassium and ammonium active transport across the human erythrocyte membrane." *Biochim. Biophys. Acta* **25**: 118 – 128.

Post, R. L.; Hegyvary, C. y Kume, S. (1972) "Activation by Adenosine Triphosphate in the Phosphorylation Kinetics of Sodium and Potassium Ion Transport Adenosine Triphosphatase." *J. Biol. Chem.* **247**: 6530 – 6540.

Post, R. L.; Merritt, C. R.; Kinsolving, C. R. y Albright, C. D. (1960). "Membrane adenosine triphosphatase as a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte." *J. Biol. Chem.* **235**: 1796 – 1802.

Post, R. L.; Sen, A. K. y Rosenthal, A. S. (1965). "A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphatase-dependent sodium and potassium transport across kidney membranes." *J. Biol. Chem.* **240**: 1437 – 1445.

Ritov, V. B.; Murzakhmetova, M. K.; Tverdislova, I. L.; Menshikova, E. V.; Butylin, A. A.; Avakian, T. Y. y Yakovenko, L. V. (1993). "Alamethicin as a permeabilizing agent for measurements of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent ATPase activity in proteoliposomes, sealed membrane vesicles, and whole cells." *Biochim. Biophys. Acta (Biomem.)* **1148**: 257 – 262.

Rossi, R. C. y Nørby, J. G. (1993). "Kinetics of  $\text{K}^{+}$ -stimulated Dephosphorylation and Simultaneous  $\text{K}^{+}$  Occlusion by Na,K-ATPase, Studied with the  $\text{K}^{+}$  Congener  $\text{Tl}^{+}$ ." *J. Biol. Chem.* **268**: 12579 – 12590.

Rossi, R. C.; Kaufman, S. B.; González-Lebrero, R. M.; Nørby, J. G. y Garrahan, P. J. (1999). "An Attachment for Nondestructive, Fast-Quenching of Samples in Rapid-Mixing Experiments." *Anal. Biochem.* **270**: 276 – 285.

Saidel, L. J.; Goldfarb, A. R. y Waldman, S. (1952). "The Absorption Spectra of Amino Acids in the Region Two Hundred and Two Hundred and Thirty Millimicrons." *J. Biol. Chem.* **197**: 285 – 291.

Schack, V. R.; Morth, J. P.; Toustrup-Jensen, M. S.; Anthonisen, A. N.; Nissen, P.; Andersen, J. P. y Vilsen, B. (2008). "Identification and function of a cytoplasmic  $\text{K}^{+}$  site of the  $\text{Na}^{+}$ ,  $\text{K}^{+}$ -ATPase." *J. Biol. Chem.* **283**: 27982 – 27990.

Schatzmann, H. J. (1953). "Herzglycoside als Hemmstoffe für den activen Kalium und Natrium Transport durch die Erythrocyten-membran." *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta* **11**: 346 – 354.

Schulz, S. y Apell, H. J. (1995). "Investigation of ion binding to the cytoplasmatic binding sites of the Na,K-pump." *Eur. Biophys. J.* **23**: 413 – 421.

Shani, M.; Goldshleger, R. y Karlish, S. J. D. (1987). "Rb<sup>+</sup> occlusion in renal (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>)-ATPase characterized with a simple manual essay." *Biochim. Biophys. Acta* **904**: 13 – 21.

Shani-Sekler, M.; Goldshleger, R.; Tal, D. y Karlish, S. J. D. (1988). "Inactivation of Rb<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> Occlusion on (Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>)-ATPase by Modification of Carboxyl Groups." *J. Biol. Chem.* **263**: 19331 – 19341.

Shinoda, T.; Ogawa, H.; Cornelius, F. y Toyoshima, C. (2009). "Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution." *Nature* **459**: 446 – 450.

Silva, J. E. (2006). "Thermogenic Mechanisms and their Hormonal Regulation." *Physiol. Rev.* **86**: 435 – 464.

Simons, T. J. B. (1974). "Potassium-potassium exchange catalysed by the sodium pump in human red cells." *J. Physiol.* **237**: 123 – 155.

Simons, T. J. B. (1975). "The interaction of ATP analogs possessing a blocked  $\gamma$ -phosphate group with the sodium pump in human red cells." *J. Physiol.* **244**: 731 – 739.

Skou, J. C. (1957). "The influence of some cations on an adenosinetriphosphatase from periferal nerves." *Biochim. Biophys. Acta* **23**: 394 – 401.

Skou, J. C. (1960). "Further investigations on a Mg<sup>++</sup> + Na<sup>+</sup>-activated adenosinetriphosphatase, possibly related to the active, linked transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> across the nerve membrane." *Biochim. Biophys. Acta* **42**: 6 – 23.

Skou, J. C. (1962). "Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>." *Biochim. Biophys. Acta* **58**: 314 – 325.

Skou, J. C. y Esmann, M. (1981). "Eosin, a fluorescent probe of ATP binding to the  $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{-ATPase}$ ." *Biochim. Biophys. Acta* **647**: 232 – 240.

Steinbach, H. B. (1940). "Sodium and potassium in frog muscle." *J. Biol. Chem.* **133**: 695 – 701.

Steinberg, M. y Karlsh, S. J. D. (1989). "Studies on Conformational Changes in Na,K-ATPase Labeled with 5-Iodoacetamidofluorescein." *J. Biol. Chem.* **264**: 2726 – 2734.

Straub, F. B. (1953). "Über die Akkumulation der Kaliumionen durch menschliche Blutkörperchen." *Acta Physiol. Acad. Sci. Hung.* **4**: 235 – 240.

Tanford, C. (1983). "Translocation pathway in the catalysis of active transport." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3701 – 3705.

Yamaoka, K.; Nakagawa, T. y Uno, T. (1978). "Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations." *Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics* **6**: 165 – 175.







